

THÈSE PRÉSENTÉE  
POUR OBTENIR LE GRADE DE  
**DOCTEUR DE**  
**L'UNIVERSITÉ DE BORDEAUX**

ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES CHIMIQUES

SPÉCIALITÉ CHIMIE PHYSIQUE

Par Marie-Lise JOBIN

**Etude du mécanisme d'interaction des peptides vecteurs  
riches en arginine avec des membranes lipidiques modèles**

Sous la direction de : Isabel D. ALVES

Soutenue le 30 septembre 2014

Membres du jury :

Prof. LECOMMANDOUX Sébastien	Professeur, Université de Bordeaux	Président du jury
Dr. LANDON Céline	Chargée de recherche, CNRS, Université d'Orléans	Rapporteur
Prof. PRIETO Manuel	Professeur, Université de Lisbonne	Rapporteur
Dr. DESHAYES Sébastien	Chargé de recherche, CNRS, Université de Montpellier	Examineur
Dr. SAGAN Sandrine	Directrice de recherche, CNRS, Université Paris 6	Examineur
Dr. ALVES Isabel	Chargée de recherche, CNRS, Université de Bordeaux	Directrice de thèse



# ETUDE DU MECANISME D'INTERACTION DES PEPTIDES VECTEURS RICHES EN ARGININE AVEC DES MEMBRANES LIPIDIQUES MODELES

**Résumé :** Les peptides vecteurs riches en Arginine (Arg) ont la faculté de transporter des molécules à travers les membranes cellulaires, d'une manière récepteur- et énergie-indépendante, sans toxicité envers la cellule et présentent ainsi un fort potentiel pour la libération de molécules thérapeutiques ou diagnostiques. La compréhension du mécanisme d'internalisation cellulaire et de l'interaction membranaire de ces peptides vecteurs est donc primordiale pour leur développement pharmaceutique. Dans cette étude, deux peptides vecteurs riches en Arg et dérivés de la pénétratine ont été étudiés : les peptides RW16 (RRWRRWWRRWWRRWRR) et RW9 (RRWVRRWRR). Dans un premier temps, l'analyse biophysique complète de l'interaction peptide/lipide (P/L) a été réalisée pour le peptide RW16 et une interaction favorisée en présence de lipides anioniques a été révélée. Dans un second temps, des peptides dérivés de RW9 ont été synthétisés dans lesquels chaque tryptophane a été systématiquement remplacé par une phenylalanine. L'internalisation cellulaire et les interactions P/L de RW9 ont été étudiées, et l'importance de la position et du nombre de tryptophane dans la séquence peptidique a été mise en évidence.

**Mots clés :** Peptides vecteurs riches en arginine; Internalisation cellulaire; Interaction peptide/lipide;



**Institut de Chimie et de Biologie des  
Membranes et des Nano-objets**

Allée Geoffroy St Hilaire  
33600 Pessac





# INTERACTION MECHANISM STUDY OF ARGININE-RICH CELL-PENETRATING PEPTIDES WITH LIPID MEMBRANE MODELS

**Abstract:** Cell-penetrating peptides (CPPs) are able to efficiently transport cargos across cell membranes in a receptor- and energy-independent manner, without being cytotoxic to cells and thus present a great potential in drug delivery and diagnosis. The understanding of the cellular internalization and membrane interaction mechanisms is thus fundamental for their pharmaceutical development. In this study, two Arginine-rich CPPs derived from penetratin have been investigated: the peptides RW16 (RRWRRWWRRWWRRWRR) and RW9 (RRWWRRWRR). Firstly, a complete biophysical study of the peptide/lipid (P/L) interactions of RW16 has been accomplished and a preferential interaction for anionic lipids was demonstrated. Secondly, peptides derived from RW9 have been synthesized where tryptophan residues have been systematically replaced by phenylalanine. Cellular internalization and P/L interactions have been characterized, and the importance of the number and position of tryptophan has been highlighted.

**Keywords:** Arginine-rich CPPs; Cellular internalization; Peptide/lipid interaction



**Institut de Chimie et de Biologie des  
Membranes et des Nano-objets**

Allée Geoffroy St Hilaire  
33600 Pessac



## REMERCIEMENTS

Ce travail de doctorat a été réalisé à l'Institut de Chimie et de Biologie des Membranes et des Nano-objets (CBMN) à l'Université de Bordeaux, et a été financé par une bourse du Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche.

Je souhaite tout d'abord remercier le Prof. Erick J. Dufourc, directeur du CBMN, pour m'avoir accueillie dans son laboratoire.

Je tiens à remercier le Dr. Céline Landon et le Prof. Manuel Prieto qui ont accepté d'évaluer ce travail en qualité de rapporteurs. Je remercie également les Dr. Sandrine Sagan et Sébastien Deshayes ainsi que le Prof. Sébastien Lecommandoux d'avoir accepté d'être membres du jury en tant qu'examineurs. Je les remercie pour l'attention qu'ils ont portée à la lecture de mon manuscrit et pour la qualité de la discussion que nous avons pu avoir à la suite de ma soutenance de thèse.

Je tiens tout particulièrement à remercier ma directrice de thèse, le Dr. Isabel Alves, pour ces trois années de doctorat. Je te remercie tout d'abord pour m'avoir accordé une grande confiance sur ce projet mais aussi pour ton dynamisme, ton enthousiasme et ta disponibilité tout au long de ces trois années. Je te remercie de m'avoir donné l'opportunité de participer à de nombreux congrès et formations. Merci aussi de m'avoir fait découvrir le Portugal, la cuisine portugaise et (un peu !) le portugais !!

Je voudrais remercier le Prof. Bernard Desbat de m'avoir accepté dans son équipe ainsi que pour ses conseils avisés sur l'ellipsométrie. Mes remerciements vont aussi au Dr. Sophie Lecomte. Grâce à ton enthousiasme, ta grande disponibilité et tes compétences, tu as fait de cette équipe un environnement scientifique agréable et dynamique où il fait bon travailler. Je remercie également mes collègues de l'équipe SPIMPAM : Etienne, toujours avec ta bonne humeur et humour! et le Dr. Sabine Castano.

Je n'oublie pas l'équipe de gestion du CBMN, pour leur gentillesse et leur efficacité qui ont été d'une grande aide au cours de ces trois années.

Je tiens à remercier les chercheurs des différentes équipes de recherche du CBMN ou de différents laboratoires avec qui j'ai eu l'opportunité de travailler au cours de ces 3 années et sans qui je n'aurais pu réaliser ce travail.

Je tiens à exprimer toute ma reconnaissance au Dr. Claude Manigand, pour avoir partagé avec moi les bonnes recettes et le savoir-faire d'un bon cocktail de clivage ! Je te suis infiniment reconnaissante pour ta disponibilité, tes nombreux conseils et les discussions que nous avons pu avoir.

Stéphane Chaignepain, un grand merci pour ton aide précieuse pour mes analyses d'échantillons par spectrométrie de masse et pour n'avoir jamais refusé une analyse même lorsque j'apportais une « masse » d'échantillons !

Je tiens à remercier le Dr. Pierre Bonnafous pour les images de Cryo-Microscopie Electronique, le Dr. François Dole du CRPP pour m'avoir initiée à l'ITC, le Dr. Anne Bourdoncle de l'IECB, qui m'a permis d'utiliser leur spectromètre de fluorescence et le Dr. Gilles Guichard ainsi que son équipe pour m'avoir formée à la synthèse chimique sur support solide.

Je tiens à adresser mes plus vifs remerciements au Dr. Sandrine Sagan et son équipe avec qui j'ai eu beaucoup de plaisir à partager quelques semaines de ma thèse à Paris et qui m'ont enseigné l'art de quantifier l'internalisation des CPPs par spectrométrie de masse !

Je souhaite également remercier les Dr. Patrick Fuchs et Lydie Vamparys avec qui j'ai eu l'opportunité de travailler sur les simulations de dynamique moléculaire.

Un grand merci aux "BAMeux" : Julie, merci pour nos discussions et tes précieux conseils, Axelle, merci pour ta gentillesse, ta disponibilité et ta bonne humeur, ainsi que Cécile, Estelle, Jeannot, Aurélien, les 2 anciens, toujours de bons conseils ;-), Denis, Vanessa U. et Nicole.

Enfin, un grand merci à tous ceux qui ont rendu ces trois années agréables à vivre au quotidien : les anciens de l'équipe : Seydou et Ha Phuong. Vincent, vive nos sessions squash intensives et merci de ne jamais m'avoir laissé gagner !, Audrey, c'était génial de t'avoir comme collègue, merci pour ta présence et pour nos nombreuses discussions. Mes deux acolytes : Sarah et Jade, les deux "petites" dernières de l'équipe, merci infiniment pour votre soutien constant (en particulier ces derniers mois !) et pour votre bonne humeur quotidienne. Un grand merci à Marine Blanchet, que j'ai eu la chance d'encadrer pour son stage de Master 2.

Je remercie également mes collègues du « 1<sup>er</sup> » et du « 2<sup>ème</sup> » : Alexis, Grégoire, Laurence, Clémence, Emilie, Tiphaine, Julien G.; et de l'IECB, Stéphanie, ma chimiste préférée, merci pour tout!

Enfin, je tiens à remercier du fond du cœur ma famille et mes amis qui m'ont toujours soutenu et encouragé dans ce projet laborieux mais passionnant : mon frère, Jean-Baptiste, mes parents, Catherine et Eric, et Sébastien, merci pour ton infinie patience et ton soutien inconditionnel.



# TABLE DES MATIERES

<b>PREFACE .....</b>	<b>23</b>
<b>INTRODUCTION .....</b>	<b>29</b>

## CHAPITRE I

### LES MEMBRANES CELLULAIRES..... 31

I. QU'EST-CE QU'UNE MEMBRANE CELLULAIRE ? .....	33
II. LA COMPOSITION DE LA MEMBRANE.....	36
II. 1. Les lipides membranaires .....	36
II. 1. 1. Les glycérophospholipides .....	36
II. 1. 2. Les sphingolipides.....	37
II. 1. 3. Les stérols .....	39
II. 2. Les protéines membranaires .....	40
II. 3. Les sucres membranaires .....	43
III. L'ASYMETRIE MEMBRANAIRE.....	45
III. 1. La diffusion latérale.....	47
III. 2. La diffusion transversale (« Flip-flop ») .....	47
IV. L'HETEROGENEITE MEMBRANAIRE : LES RADEAUX LIPIDIQUES.....	49
V. LES MEMBRANES : UN ASSEMBLAGE LIPIDIQUE A GEOMETRIE VARIABLE .....	50
VI. MIMER LA COMPLEXITE BIOLOGIQUE DES MEMBRANES.....	53
VI. 1. Les liposomes.....	54
VI. 1. 1. Les Vésicules Multi-Lamellaires (MLVs) .....	55
VI. 1. 2. Les Petites Vésicules Unilamellaires (SUVs) .....	55
VI. 1. 3. Les Vésicules Grandes Unilamellaires (LUVs).....	56
VI. 1. 4. Les Vésicules Unilamellaires Géantes (GUVs) et les Vésicules de Membranes Plasmiques Géantes (GPMVs) .....	57
VI. 2. Les micelles et bicelles .....	58

## CHAPITRE II

### LES PEPTIDES VECTEURS : « CELL-PENETRATING PEPTIDES » ..... 63

I. ORIGINE ET CLASSIFICATION DES CPPs .....	65
I. 1. Peptides dérivés de protéines .....	66
I. 2. Peptides chimériques.....	68
I. 3. Peptides synthétiques.....	69
II. LES FONCTIONS DES CPPs : DES AGENTS TRIPLES ? .....	72
II. 1. Le transport intracellulaire de molécules d'intérêt.....	72

II.1.1.	Quels types de cargaisons ? .....	72
II.1.2.	Quelle liaison entre la cargaison et le CPP ? .....	73
II. 2.	Quel mécanisme d'internalisation cellulaire ? .....	74
II.2.1.	Interactions des CPPs avec les membranes cellulaires .....	76
II.2.2.	L'endocytose dépendante des cavéoles/radeaux lipidiques .....	79
II.2.3.	L'endocytose dépendante des clathrines .....	79
II.2.4.	La macropinocytose .....	79
II.2.5.	La translocation directe .....	81
II. 3.	Effet de la cargaison sur l'internalisation des CPPs .....	82
II. 4.	Méthodes d'études de l'internalisation .....	82
II. 5.	Spécificité des CPPs pour les cellules cancéreuses .....	86
II. 6.	Activité antimicrobienne des CPPs .....	88
III.	LES CPPs ETUDIES AU COURS DE CE DOCTORAT : OBJECTIFS .....	92
III. 1.	RWI6 .....	92
III. 2.	RW9 et RX9 .....	92

## **RESULTATS & DISCUSSION..... 95**

### **CHAPITRE III**

#### **ETUDE DE L'INTERACTION DE RWI6 AVEC DES MEMBRANES MODELES ..... 97**

I.	LE PEPTIDE VECTEUR RWI6 .....	99
I. 1.	Activité antimicrobienne de RWI6 .....	100
I. 2.	Oligomérisation du peptide en solution .....	101
II.	EFFET DES MEMBRANES SUR RWI6 .....	104
II. 1.	Fluorescence de RWI6 en présence de vésicules lipidiques .....	104
II. 2.	Structure secondaire de RWI6 .....	107
III.	EFFET DE RWI6 SUR DES MEMBRANES MODELES .....	109
III. 1.	Effet du peptide sur l'intégrité, la distribution et la taille des liposomes .....	109
IV.	PERTURBATION DE L'ORGANISATION LIPIDIQUE .....	116
V.	INSERTION DU PEPTIDE DANS LES MEMBRANES .....	123
VI.	AFFINITE DU PEPTIDE POUR LES MEMBRANES .....	131
VII.	CONCLUSIONS .....	138

### **CHAPITRE IV**

#### **INTERNALISATION CELLULAIRE ET INTERACTION MEMBRANAIRE DE RW9 ET DE SES DERIVES RX9 ..... 145**

I.	RW9 ET SES ANALOGUES RX9 .....	147
----	--------------------------------	-----



II.	CYTOTOXICITE DES DERIVES RX9 .....	149
III.	INTERNALISATION CELLULAIRE ET ACCUMULATION DES PEPTIDES RX9 A LA MEMBRANE ....	151
IV.	INTERACTION PEPTIDE/LIPIDE DES RX9.....	154
IV. 1.	Effet des RX9 sur la taille et l'intégrité des liposomes.....	154
V.	EFFET DES MEMBRANES SUR LES RX9 .....	157
VI.	PARTITION ET AFFINITE DES RX9 POUR DES MEMBRANES MODELES .....	161
VII.	INSERTION DES PEPTIDES DANS LES MEMBRANES .....	170
VIII.	INTERNALISATION DES CPPS DANS LES LIPOSOMES.....	173
IX.	CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES .....	181
<b>CONCLUSIONS GENERALES.....</b>		<b>187</b>
<b>MATERIELS &amp; METHODES .....</b>		<b>193</b>
I.	MATERIELS.....	195
I. 1.	Lipides et détergents.....	195
I. 2.	Peptides .....	196
II.	METHODES.....	196
II. 1.	Compositions des tampons.....	196
II. 2.	Synthèse chimique des RX9.....	197
II. 3.	Tests de cytotoxicité.....	201
II. 4.	Quantification de l'internalisation dans les cellules.....	202
II. 5.	Quantification de peptide lié à la membrane.....	205
II. 6.	Préparation des vésicules .....	206
II.6.1.	Vésicules multi-lamellaires (MLVs).....	206
II.6.2.	Vésicules Grandes Unilamellaires (LUVs).....	206
II.6.3.	Petites Vésicules Unilamellaires (SUVs) .....	207
II. 7.	Absorbance UV .....	207
II. 8.	Diffusion Dynamique de la Lumière (DLS) .....	208
II. 9.	Calorimétrie .....	210
II.9.1.	Calorimétrie de Titration Isotherme (ITC).....	210
II.9.2.	Calorimétrie à Balayage Différentielle (DSC) .....	211
II. 10.	Résonance Magnétique Nucléaire (RMN).....	214
II.10.1.	RMN <sup>31</sup> P .....	214
II.10.2.	RMN <sup>1</sup> H.....	214
II. 11.	Résonance Plasmonique aux Ondes guidées (PWR).....	215

II. 12.	Spectroscopie de Fluorescence .....	219
II.12.1.	Fuites de calcéine.....	219
II.12.2.	Coefficient de partition de Nernst (Kp) .....	221
II.12.3.	Inhibition de fluorescence avec des lipides bromés.....	222
II.12.4.	Inhibition de la fluorescence par l'acrylamide.....	223
II.12.5.	Internalisation dans les liposomes .....	224
II. 13.	Dichroïsme circulaire (CD).....	224
II. 14.	Infrarouge à Transformée de Fourier (ATR-FTIR) .....	228
II. 15.	Microscopie électronique à Transmission (Cryo-TEM).....	231
II. 16.	Dynamique Moléculaire (MD).....	232
<b>REFERENCES .....</b>		<b>237</b>
<b>PUBLICATIONS.....</b>		<b>259</b>





## LISTE DES ABREVIATIONS

<b>ADN</b> Acide DesoxyriboNucléique	Medium
<b>Apa</b> Acide Aminopentanoïque	<b>EDTA</b> Acide éthylène glycol tétra-acétique
<b>ATP</b> Adénosine Triphosphate	<b>eggPC</b> Phosphatidylcholine d'oeuf
<b>ATR</b> Réflexion Totale Atténuée	<b>Fmoc</b> 9-fluorenylméthoxycarbonyl
<b>BSA</b> Serum d'Albumine Bovine	<b>GAG</b> Glycosaminoglycane
<b>SDC</b> Syndecane	<b>GPI</b> Glycophosphatidylinositol
<b>CD</b> Circular Dichroism	<b>GPC</b> Glypicane
<b>CHCA</b> $\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamic acid	<b>GSL</b> Glycosphingolipide
<b>CHO</b> Chinese Hamster Ovary	<b>GUV</b> Vésicules Unilamellaires Géantes
<b>CPP</b> Cell-Penetrating Peptide	<b>HBSS</b> Solution saline tampon de Hank
<b>CS</b> Chondroitin Sulfate	<b>HBTU</b> O-(benzotriazol-1-yl)-N, N, N', N'-tetraméthyluronium
<b>DCM</b> Dichlorométhane	hexafluorophosphate
<b>DIEA</b> N,N-diisopropyléthylamine	<b>HIV</b> Human Immunodeficiency Virus
<b>DLS</b> Dynamic Light Scattering	<b>HPLC</b> Chromatographie en phase liquide à haute performance
<b>DMF</b> Diméthylformamide	<b>HS</b> Heparan Sulfate
<b>DMPC</b> 1,2-dimyristoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphatidylcholine	<b>HSPG</b> Heparan Sulfate Proteoglycan
<b>DMPG</b> 1,2-dimyristoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphatidylglycérol	<b>HSQC</b> Heteronuclear single quantum coherence
<b>DPC</b> Dodécylphosphocholine	<b>ITC</b> Calorimétrie de Titration Isotherme
<b>DOPC</b> 1,2-dioleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphatidylcholine	<b>KS</b> Sulfate de Keratane
<b>DOPE</b> 1,2-dioleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphatidyléthanolamine	<b>Ld ; L<math>\alpha</math></b> Phase désordonnée liquide
<b>DOPG</b> 1,2-dioleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphatidylglycérol	<b>L<math>\beta</math></b> Phase gel
<b>DOPG</b> 1,2-dioleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphatidylsérine	<b>Lo</b> Phase liquid ordonnée
<b>DSC</b> Calorimétrie à Balayage Différentiel	<b>LUV</b> Vésicules Grandes Unilamellaires
<b>DMEM</b> Dulbecco's Modified Eagle	<b>MALDI-TOF</b> Désorption/ionisation assistée par matrice – Temps de vol
	<b>MAP</b> Peptide Amphipatique Modèle

<b>MD</b> Dynamique Moléculaire	<b>P/L</b> Ratio peptide/lipide
<b>MeCN</b> Acétonitrile	<b>PNA</b> Peptide-nucleic acid
<b>MIC</b> Concentration Minimale Inhibitrice	<b>PS</b> Phosphatidylserine
<b>MLV</b> Vésicules Multi-lamellaires	<b>PTD</b> Domaine de Transduction protéique
<b>MS</b> Spectrométrie de masse	<b>pVEC</b> Peptide dérivé de la cadhérine vasculaire endothéliale
<b>NAD(P)<sup>+</sup></b> Nicotinamide Adénine Dinucléotide (Phosphate) (Forme oxydée)	<b>PWR</b> Résonance Plasmonique aux ondes guidées
<b>NAD(P)H</b> Nicotinamide Adénine Dinucléotide (Phosphate) (Forme réduite)	<b>SA</b> Acide Sialique
<b>NMR</b> Résonance Magnétique Nucléaire	<b>SM</b> Sphingomyéline
<b>ODN</b> 2-5A Oligonucléotides	<b>STI</b> Soybean Trypsin Inhibitor
<b>ON</b> Oligonucléotide	<b>SUV</b> Petites Vésicules Unilamellaires
<b>NLS</b> Nuclear Localization Sequence	<b>SVF</b> Sérum de Veau Fœtal
<b>NOESY</b> Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy	<b>Tat</b> Trans-Activateur de la Transcription
<b>PC</b> Phosphatidylcholine	<b>TEM</b> Microscopie électronique à transmission
<b>PE</b> Phosphatidyléthanolamine	<b>TFA</b> Acide Trifluoroacétique
<b>PG</b> Phosphatidylglycerol	<b>TOCSY</b> Total Correlation Spectroscopy
<b>PI</b> Phosphatidylinositol	







« L'histoire du cheval  
Qu'Épéios, assisté d'Athéna, construisit,  
Et traquenard qu'Ulysse conduisit à l'acropole  
Surchargé de soldats qui allaient piller Troie. »

Homère, traduction de Leconte de L'isle, Odyssée



La procession du Cheval de Troie à Troie, 1773, Giovanni Domenico Tiepolo



# PREFACE

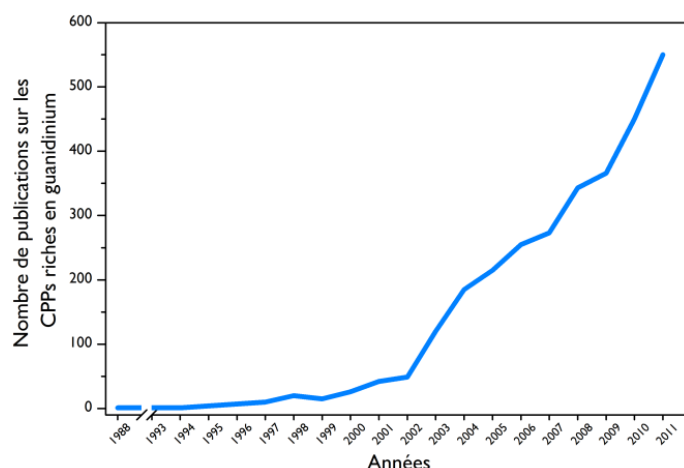
Le développement de systèmes alternatifs pour la libération de médicaments et leur acheminement jusqu'à l'intérieur des cellules est un des enjeux thérapeutiques majeurs du XXI<sup>e</sup> siècle. En effet, le développement d'agents thérapeutiques reste souvent limité par leur spécificité et leur efficacité de libération intracellulaire par les méthodes de vectorisation actuelles. L'obstacle principal, relatif à cette difficulté d'acheminement des molécules dans les cellules, réside dans la présence d'une barrière naturelle que constitue la membrane plasmique, délimitant l'ensemble des cellules vivantes.

La membrane plasmique délimite et protège les cellules de tous les composants extérieurs toxiques ou bien facilite l'entrée de molécules qui lui sont nécessaires. De nombreuses molécules et techniques ont été imaginées pour développer cette capacité à traverser les membranes cellulaires notamment grâce à des vecteurs viraux ou en tirant profit de récepteurs cellulaires présents à la surface des cellules. Cependant, leur efficacité est limitée en raison de leur faible spécificité cellulaire ou de leur biodisponibilité intracellulaire.

A partir des années 1990, les peptides vecteurs font leur apparition dans la littérature scientifique et l'on découvre dans ces nouvelles molécules un potentiel thérapeutique considérable. En effet, le nombre de publications dans ce domaine a considérablement augmenté depuis leur découverte initiale en 1988 (Figure 1). Les peptides vecteurs sont appelés « Cell-penetrating peptides » (CPPs) pour leur propriété de pénétration cellulaire. Leur intérêt réside dans leur capacité à pouvoir vectoriser une grande diversité de biomolécules actives telles que des protéines, des oligonucléotides ou des nanoparticules, dans le milieu intracellulaire et sans toxicité envers la cellule. Leur appellation « Peptides de Troie » (« Trojan peptides ») résulte de cette capacité à être internalisés sans être détruits par les cellules.

Depuis leur apparition, de nouveaux peptides vecteurs ont été découverts ou synthétisés et leur développement s'est accru de manière exponentielle. De nombreux éléments, concernant leur voie d'internalisation ou leur différence d'internalisation malgré des séquences peptidiques très proches, sont encore inconnus à ce stade bien que ces vingt dernières années aient permis de réaliser des avancées majeures sur la caractérisation de leur comportement envers la membrane et les cellules.

Pour le développement et l'amélioration de telles molécules, notamment pour la compréhension de leur mécanisme d'interaction avec les membranes plasmiques et l'identification des « routes cellulaires » empruntées par ces molécules pour pénétrer l'espace intracellulaire, leur caractérisation est indispensable.



**Figure 1.** Statistiques représentant le nombre de publications par an sur les CPPs riches en guanidinium depuis leur découverte en 1988. D'après [1].

Les récentes études sur les CPPs ont révélé que différents mécanismes d'internalisation peuvent intervenir : l'endocytose et la translocation directe. Ce dernier mécanisme d'internalisation a été proposé dans les années 1990 et semblait alors inconcevable pour la communauté scientifique. Les nombreuses études cellulaires et biophysiques réalisées afin d'étudier spécifiquement cette voie d'internalisation ont tout de même mis en évidence son importance dans le processus de translocation des peptides vecteurs. Dans ce contexte, l'objectif de mon travail de thèse concerne la caractérisation biophysique de deux types de CPPs, riches en arginine et dérivés de la pénétratine, en présence de modèles membranaires.

Ainsi, dans un premier temps, le mécanisme d'interaction membranaire d'un peptide vecteur aux propriétés anticancéreuses a été étudié par une analyse biophysique complète de son interaction avec des lipides. Dans une seconde partie, des études structure/activité d'un autre peptide vecteur ont été réalisées afin de comprendre le rôle des résidus Trp dans son internalisation cellulaire et son interaction avec les membranes. Ce manuscrit se divise en trois parties. Je présenterai tout d'abord dans un premier chapitre les membranes cellulaires, leur structure et leurs rôles dans les cellules, puis les CPPs, de leur découverte jusqu'à la description de leur mécanisme d'action. Je présenterai ensuite les résultats obtenus au cours de cette thèse en deux chapitres et je finirai par exposer les différents matériels et méthodes employés.







# INTRODUCTION



# CHAPITRE I

## **LES MEMBRANES CELLULAIRES**

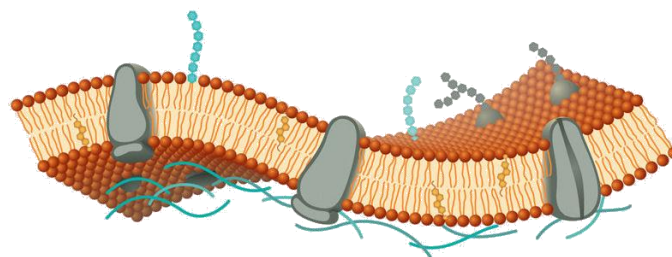


## I. Qu'est-ce qu'une membrane cellulaire ?

Les cellules sont délimitées par une membrane, barrière naturelle qui définit l'intérieur et l'extérieur de la cellule. Celle-ci empêche les molécules formées au sein d'une cellule de s'en échapper et inversement, s'oppose à la diffusion de molécules non désirées vers le cytoplasme.

Les membranes se composent essentiellement de lipides assemblés en bicouche, de protéines enchâssées parmi les lipides et de glucides liés aux lipides ou aux protéines (Figure 2). Les lipides sont formés d'une partie hydrophile et de chaînes d'acides gras hydrophobes qui induisent une perméabilité de la membrane vis-à-vis du milieu extérieur aqueux. Les acides gras sont les constituants essentiels des lipides. Les membranes ont un cœur hydrocarboné, de par la présence des acides gras, qui les rend essentiellement imperméables à la plupart des molécules biologiques, comme les acides aminés, sucres, protéines, acides nucléiques et les ions. Toutes ces molécules sont solubles dans l'eau et insolubles dans des solvants hydrocarbonés et c'est ce qui permet à la membrane de fonctionner en tant que barrière.

Les membranes biologiques sont des structures dynamiques et il est désormais largement admis qu'elles assurent des fonctions fondamentales pour la vie, principalement assurées par des protéines membranaires.

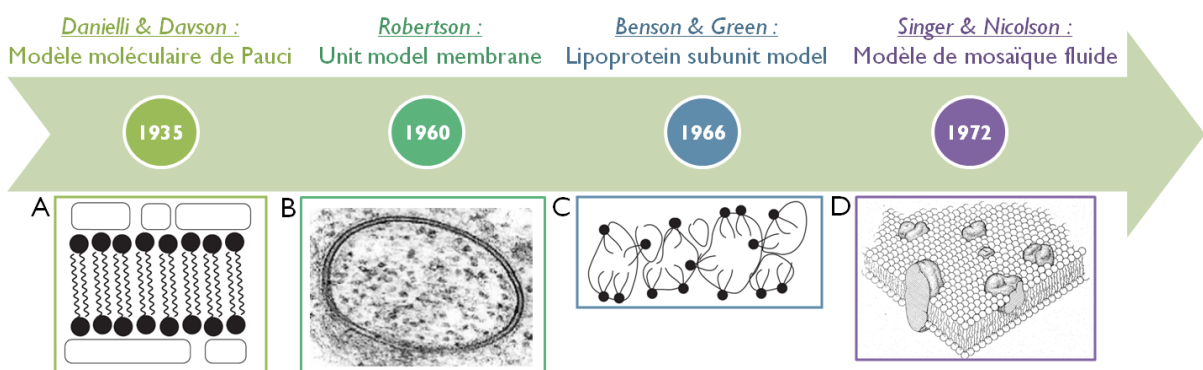


**Figure 2.** Modèle de membrane composée de lipides (orange), cholestérol (jaune), protéines membranaires (gris) et carbohydrates liés à la membrane par des lipides (bleu) ou par des protéines (gris).

Le modèle de la membrane tel qu'on le connaît aujourd'hui a fortement évolué depuis le premier modèle décrit en 1935 par Danielli & Davson [2]. Ce modèle pose alors les premières briques d'un modèle constitué d'une bicouche lipidique appelé « modèle moléculaire de Pauci ». Ils étaient ainsi les premiers à décrire la membrane cellulaire composée d'une bicouche lipidique, même si Gorter & Grendel ont évoqué dès 1925 la possibilité de la présence d'une barrière lipidique sans pour autant proposer de modèle [3]. Le modèle de Danielli & Davson stipule que les protéines restent globulaires et ne sont donc pas enchâssées dans la bicouche lipidique (Figure 3A).

Le défaut majeur de ce modèle réside dans le fait que la membrane est statique et non dynamique, les lipides sont distribués de manière symétrique et les membranes sont toutes identiques. En 1960, Robertson observe grâce à des images de microscopie électronique, une membrane qui aurait la forme d'une « voie ferrée », composée de 2 « bandes foncées » et séparées par une « bande claire », et propose le modèle de membrane appelé « Unit membrane model » [4] (Figure 3B). Cette membrane, semblable à celle décrite par Danielli & Davson, apporte en plus une mesure précise de l'épaisseur de la bicouche : les deux parties « foncées » seraient épaisses de 25 Å, la partie « claire » centrale de 25 Å, formant ainsi une bicouche de 75 Å. De la même manière que pour le modèle de Danielli & Davson, les protéines seraient situées en continu le long de la membrane.

En 1966, Benson & Green proposent le modèle de « Lipoprotein subunit model » qui néglige alors certaines données expérimentales qui jouent en faveur de la bicouche lipidique [5; 6]. Ainsi, le modèle de Benson & Green n'inclurait pas de bicouche lipidique mais une monocouche de lipoprotéines (Figure 3C).



**Figure 3.** Les différents modèles de membranes proposés depuis 1935.

En 1972, Singer & Nicolson proposent le modèle de la mosaïque fluide qui restera le modèle actuel communément accepté [7]. Dans leur publication, Singer & Nicolson décrivent la membrane cellulaire comme une « solution visqueuse orientée en 2D, composée de protéines amphipatiques (ou lipoprotéines) et des lipides en équilibre instantané » (Figure 3D).

Ce modèle réintègre la bicouche lipidique de Danielli & Davson mais suggère que les protéines soient périphériques ou intégrales, et distribuées asymétriquement sur la surface de la membrane. Ils proposent la présence de carbohydrates attachés aux protéines (glycoprotéines) et aux lipides (glycolipides).

Les protéines intégrales seraient ainsi des protéines globulaires et amphipatiques, dont une partie serait insérée dans la membrane. Les composants membranaires sont donc structurés comme une « mosaïque ». L'élément essentiel de ce modèle réside dans la notion de fluidité et de dynamique : dans la membrane, les lipides et protéines diffusent latéralement et constamment. Cependant, l'hétérogénéité latérale de la membrane (distribution des lipides dans la membrane) n'est pas représentée.

En 1982, Karnovsky & Klausner observent la présence de domaines lipidiques mais ce n'est qu'en 1997 que Simons suggère la présence de « radeaux lipidiques » (« lipid rafts ») dans les membranes [8; 9]. Il propose une extension du modèle de Singer & Nicolson avec la présence de plateformes enrichies en cholestérol et sphingomyéline et appauvries en PhosphatidylCholine (PC) qui « flottent » sur une matrice désordonnée de lipides et possédant un rôle dans la signalisation cellulaire.

L'adaptabilité et la flexibilité de la structure membranaire nécessaire pour s'adapter à son environnement n'est possible que grâce à la présence d'une grande variété de lipides au sein de la membrane. La membrane se présente aussi comme une matrice de support pour un grand nombre de protéines impliquées dans les nombreux processus cellulaires. Environ 20 à 35% des protéines sont intégralement membranaires, et probablement la moitié des protéines restantes exercent leur fonction à proximité de la surface membranaire [10]. Ainsi, les propriétés physico-chimiques de la membrane affectent la plupart des processus cellulaires ce qui fournit aux lipides un rôle dynamique et fonctionnel dans la cellule plutôt qu'une simple barrière statique.

Dans ce chapitre, je décris la structure d'une membrane biologique, son rôle, et les différents processus qui impliquent les membranes cellulaires et enfin les différentes techniques pour l'étudier et la mimer.

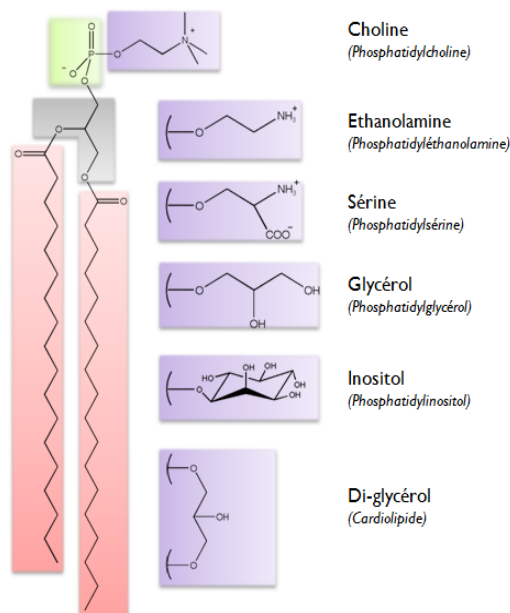
## II. La composition de la membrane

### II. I. Les lipides membranaires

#### II. I. I. Les glycérophospholipides

La longueur du squelette carboné des chaînes d'acides gras peut varier permettant notamment à la membrane de posséder une grande variabilité de sa fluidité.

Les têtes hydrophiles des lipides sont constituées de fonctions polaires, comme la choline, la sérine, l'éthanolamine et l'inositol (Figure 4). La désignation des lipides dépend de la longueur de leur squelette carboné et de la fonction polaire qui constitue la tête lipidique.



**Figure 4.** Structure des glycérophospholipides composés de différentes têtes polaires représentées en violet, le squelette carboné est représenté en rouge, la fonction glycérol est représentée en gris et la fonction phosphate est en vert.



En fonction des systèmes eucaryotes et procaryotes, la nature des lipides dans les membranes peut énormément varier (Tableau I). Le phospholipide le plus abondant dans les membranes eucaryotes est la phosphatidylcholine. Il constitue la base des membranes eucaryotes avec une proportion d'environ 40% dans les membranes eucaryotes contre 10% pour les cellules procaryotes. Les chaînes d'acides gras peuvent être soit saturées, soit insaturées. Les chaînes lipidiques insaturées fluidifient les membranes, tandis qu'un lipide saturé la rigidifie.

Lipides	Mol (%)
PC	45-55
PE	15-25
PI	10-15
PS	5-10
PA	1-2
CL	2-5
SM	5-10
Cholestérol	10-20

**Tableau I.** Composition moyenne en lipides d'une cellule de foie de mammifère. D'après [11].

### II.1.2. Les sphingolipides

Les sphingolipides sont présents chez l'ensemble des animaux, plantes, champignons, et aussi dans quelques organismes procaryotes et des virus.

Ils sont composés d'un squelette sphingoïde auquel est attaché un acide gras à travers une liaison amide et/ou une tête polaire sur l'hydroxyle primaire. Les têtes polaires peuvent être constituées d'un simple hydrogène (le sphingolipide est alors appelé un céramide ou une sphingosine) (Figure 5) ou d'autres composants plus complexes comme par exemple une phosphocholine formant ainsi une sphingomyéline (SM) ou des glycanes formant des glycosphingolipides.

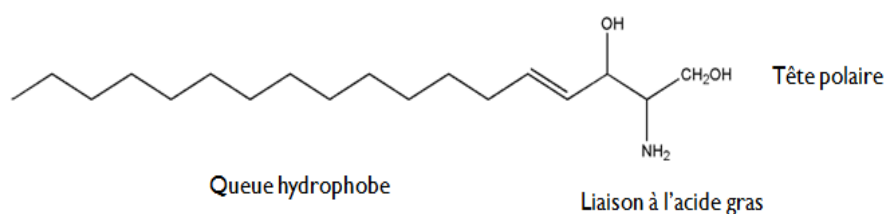
Les sphingolipides forment un domaine rigide et solide, ils constituent donc des composants structuraux des membranes mais aussi des molécules de signalisation cellulaire. Les sphingolipides sont initialement connus comme des composants de la membrane plasmique et des vésicules associées (endosomes, lysosomes, ...), aujourd'hui ils sont reconnus pour posséder des fonctions régulatrices dans toutes les membranes intracellulaires.

La sphingomyéline (SM) est le phosphosphingolipide le plus courant dans les tissus de mammifères ainsi que dans les lipoprotéines et il a été énormément étudié quant à son rôle dans la formation de domaines enrichis en cholestérol et dans la signalisation cellulaire. Comme la céramide, la SM présente une transition de phase supérieure à 37°C ce qui lui confère une tendance à s'associer avec les radeaux lipidiques.

Les sphingolipides tendent à s'associer entre eux pour former des agrégats tant avec le cholestérol qu'avec des protéines à ancre glycosylphosphatidylinositol (GPI) pour former des radeaux lipidiques.

Les sphingolipides possèdent des propriétés très diverses principalement car certains sont très insolubles (comme les céramides) et d'autres si solubles dans l'eau qu'ils restent dans la phase aqueuse quand ils sont préparés dans des solvants organiques.

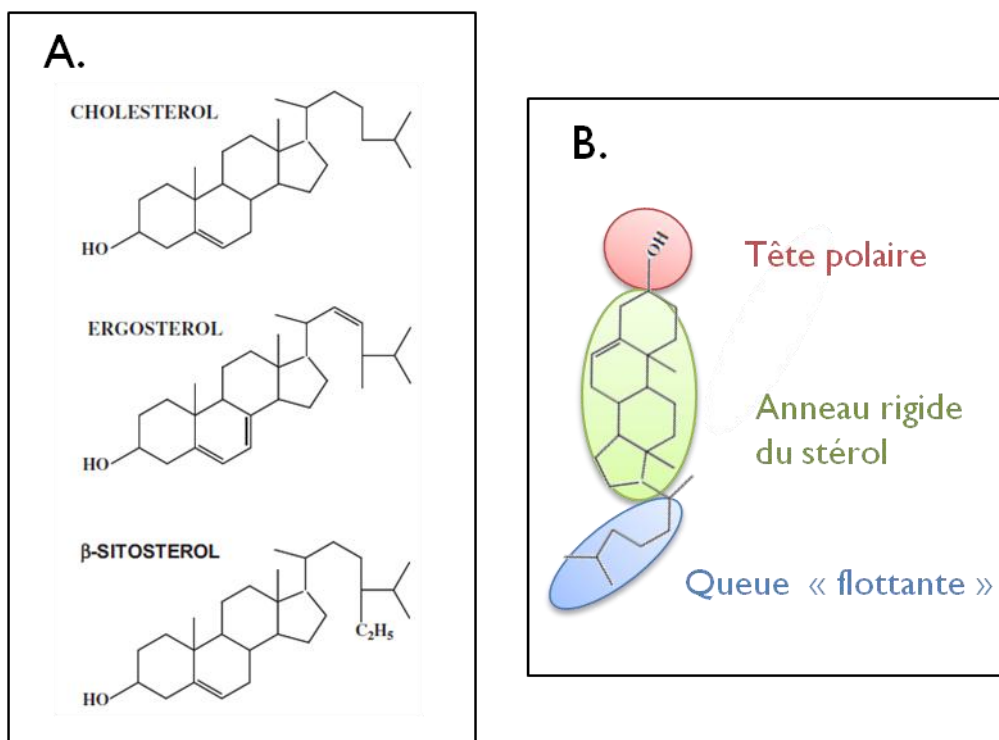
Les glycosphingolipides participent également à l'adhésion cellulaire et la communication entre cellules en se fixant à des protéines et des carbohydrates de la matrice extracellulaire. Cela structure et organise la membrane mais cela peut aussi moduler les activités des récepteurs membranaires des cellules voisines ou de leur propre membrane. Par exemple, certains sphingolipides sont employés comme site de fixation par des micro-organismes, comme des toxines microbiennes (par exemple, la fixation de GM1 par la toxine du choléra) ou des virus [12].



**Figure 5.** Structure de la sphingosine.

### II.1.3. Les stérols

Le cholestérol a été identifié pour la première fois en 1769 par François Poulletier de la Salle dans les calculs biliaires [11]. Les stérols sont présents dans toutes les membranes plasmiques eucaryotes et dans quelques membranes bactériennes en faible proportion (sous la forme d'hopanoides) mais ils sont absents des membranes procaryotes. Le principal stérol des membranes eucaryotes est le cholestérol, l'ergostérol chez les champignons et le  $\beta$ -sitostérol chez les plantes (Figure 6A).



**Figure 6.** Structure des stérols. **(A)** Différents stérols **(B)** Structure du cholestérol

Les stérols sont très insolubles dans l'eau et donc se partitionnent aisément dans les membranes. Ils sont constitués de 3 parties distinctes, chacune ayant une fonction bien définie (Figure 6B). Les stérols sont ancrés à l'interface aqueuse via un groupe hydroxyl polaire, tandis que le reste de la molécule est hydrophobe. Les 4 noyaux stérols sont responsables de sa fonction principale à savoir contrôler la fluidité membranaire et son volume libre au sein de la membrane. Cependant, le rôle de la partie "flottante" semble incertain et beaucoup moins évident [13].

Le cholestérol est un élément majeur de la membrane plasmique dans laquelle il joue un rôle de force mécanique. Il contrôle les comportements de phase de la membrane, supporte l'organisation latérale de la membrane et sa stabilité, et maintient l'homogénéité de la membrane. Il s'intercale entre les phospholipides et les sphingolipides et aide à contrôler l'organisation des lipides. Lorsque la membrane est en phase gel, le cholestérol augmente la fluidité et la perméabilité de la membrane. Au contraire, lorsque la membrane est dans un état liquide cristallin, le cholestérol augmente l'organisation des lipides et diminue la fluidité et la perméabilité de la membrane. L'insertion du cholestérol dans les membranes induit un état inhabituel de la membrane appelé état liquide ordonné (Lo) [14-16]. Les caractéristiques de ces phases lipidiques seront plus amplement développées dans la Partie V.

### II. 2. Les protéines membranaires

Les membranes sont principalement composées de lipides mais ceux-ci ont surtout un rôle de structuration de la membrane tandis que les protéines membranaires ont une fonction cellulaire bien définie. Les lipides sont environ 40 à 200 fois plus nombreux que les protéines membranaires.

Aujourd'hui, il est couramment admis que presque la moitié des protéines sont des protéines membranaires. La question est de savoir pourquoi dans certains cas une protéine préfère rester soluble et dans d'autres cas elle préfère aller se nicher dans les membranes. Cette différence est essentiellement due à la différence d'acides aminés d'une protéine et c'est cette composition en acides aminés qui détermine les segments membranaires insérés dans la membrane ou exposés au milieu extracellulaire ou cytoplasmique. Dans les années 1980, Kyte et Doolittle proposent une échelle d'hydropathie des acides aminés qui permet de prédire la localisation des protéines dans la membrane [17] (Figure 7).

Il existe deux types de protéines membranaires : les protéines périphériques (« extrinsèques ») et intégrales (« intrinsèques »). Les protéines périphériques sont des protéines globulaires externes à la membrane simplement attachées à la surface membranaire à travers des interactions électrostatiques, des hélices amphipathiques insérées dans la membrane ou grâce à des modifications lipidiques. Elles ne s'insèrent pas dans le corps hydrophobe de la membrane bien qu'elles puissent créer des interactions hydrophobes grâce à des tryptophanes (Trp) ou tyrosines (Tyr) qui sont des résidus possédant des propriétés de localisation interfaciale [18].

La présence de Trp et de Tyr à l'interface de la membrane est une des caractéristiques des protéines transmembranaires. Ces acides aminés peuvent interagir simultanément avec le cœur hydrophobe de la membrane et avec le milieu extracellulaire aqueux ayant ainsi pour rôle d'ancrer la protéine à la membrane. Ces interactions peuvent être facilement rompues en variant la force ionique du milieu ou le pH de la solution.

110 J. KYTE AND R. F. DOOLITTLE

TABLE 2

*Hydropathy scale and information used in the assignments*

Side-chain	Hydropathy index	$\Delta G_{transfer}^{o}$ (water-vapor) <sup>a</sup>	Fraction of side-chains 100% buried <sup>b</sup>	Fraction of side-chains 95% buried <sup>c</sup>
Isoleucine	4.5	4.4	4.5	5.2
Valine	4.2	4.2	4.3	4.2
Leucine	3.8	4.5	3.2	2.8
Phenylalanine	2.8	2.5	2.5	3.5
Cysteine/cystine	2.5	1.9	6.0	3.2
Methionine	1.9	1.9	1.0	1.9
Alanine	1.8	3.9	5.3	1.6
Glycine	-0.4	—	4.2	1.3
Threonine	-0.7	-0.6	-0.5	-1.0
Tryptophan	-0.9	-0.9	-2.4	-0.3
Serine	-0.8	-0.8	-0.7	-1.0
Tyrosine	-1.3	-1.1	-3.3	-2.2
Proline	-1.6	—	-2.4	-1.8
Histidine	-3.2	-4.2	-3.6	-1.9
Glutamic acid	-3.5	-3.9	-2.8	-1.7
Glutamine	-3.5	-3.5	-4.0	-3.6
Aspartic acid	-3.5	-4.5	-2.5	-2.3
Asparagine	-3.5	-3.8	-3.1	-2.7
Lysine	-3.9	-3.2	—	-4.2
Arginine	-4.5	—	—	—

All values in the last 3 columns result from arbitrary normalization to spread them between -4.5 and +4.5. The normalization functions were:  
<sup>a</sup>  $-0.679(\Delta G_{transfer}^{o} \text{ Table 1}) + 2.32$ .  
<sup>b</sup>  $48.1(\text{fraction } 100\% \text{ buried; Chothia, 1976}) - 4.50$ .  
<sup>c</sup>  $16.45(\text{fraction } 95\% \text{ buried; Chothia, 1976}) - 4.71$ .

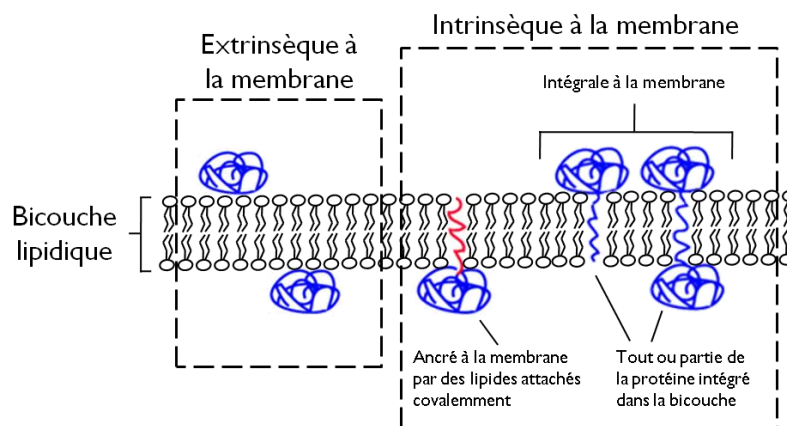
**Figure 7.** Echelle d'hydropathie d'après Kyte & Doolittle [17].

Elles peuvent être divisées en 2 types : celles qui sont attachées à des protéines intégrales via des interactions électrostatiques et celles qui sont attachées aux lipides membranaires via les charges négatives de la membrane (Figure 8).

Les protéines intégrales s'insèrent dans la partie hydrophobe de la membrane et ne peuvent être isolées que par l'utilisation de détergents. Les éléments qui en ressortent sont des protéines encerclées par un complexe lipide-détergent et insoluble dans le milieu aqueux [19].

On estime que 20 à 30 % des protéines sont intégrales et liées de façon permanente à la membrane. Les protéines membranaires intégrales ont d'abord été isolées par de l'acétone froid, détruisant la membrane et par le même biais dénaturant la protéine ce qui la rendait inutilisable pour des études biochimiques. L'utilisation d'agents chaotropiques a ensuite été largement répandue pour la séparation de protéines membranaires. Les agents chaotropiques sont des molécules fortement solubles dans l'eau qui perturbent la membrane en dissociant la molécule d'eau de la membrane ayant pour effet de supprimer le caractère hydrophobe de l'intérieur de la membrane.

Le problème majeur réside dans le fait que ce traitement peut dénaturer la protéine de façon irréversible et la rendre inutilisable pour des applications biochimiques.



**Figure 8.** Les différents types de protéines membranaires.

Certaines protéines intégrales ne traversent pas la membrane entièrement et sont localisées soit du côté cytoplasmique (endo-protéines) soit du côté extracellulaire (exo-protéines). Certaines protéines sont entièrement transmembranaires et possèdent quelques segments exposés à l'extérieur de la membrane du côté cytosolique et extracellulaire.

Les protéines membranaires sont distribuées asymétriquement de chaque côté de la membrane mais ne basculent pas d'un côté à l'autre de la membrane. Le cœur hydrophobe d'une membrane mesure environ 25 à 35 Å. La protéine transmembranaire doit donc posséder environ 20 acides aminés hydrophobes qui traversent le corps hydrophobe de la membrane.

Les protéines sont ancrées via des résidus hydrophobes formant soit des hélices  $\alpha$  (la famille des récepteurs aux protéines G en fait partie avec 7 segments transmembranaires hélicoïdaux) ou des feuillets  $\beta$  (20 segments transmembranaires forment ce qu'on appelle un tonneau  $\beta$ ), mais elles peuvent aussi être ancrées dans la membrane grâce à un lipide. Les lipides qui jouent le rôle d'ancrage à la membrane du côté cytosolique peuvent être des groupes palmitoyls (C16 :0), myristoyls (C14 :0) ou prényles tandis que les protéines ancrées du côté aqueux le sont généralement via une ancre glycosylphosphatidylinositol (GPI). La plupart des protéines transmembranaires sont fortement glycosylées.

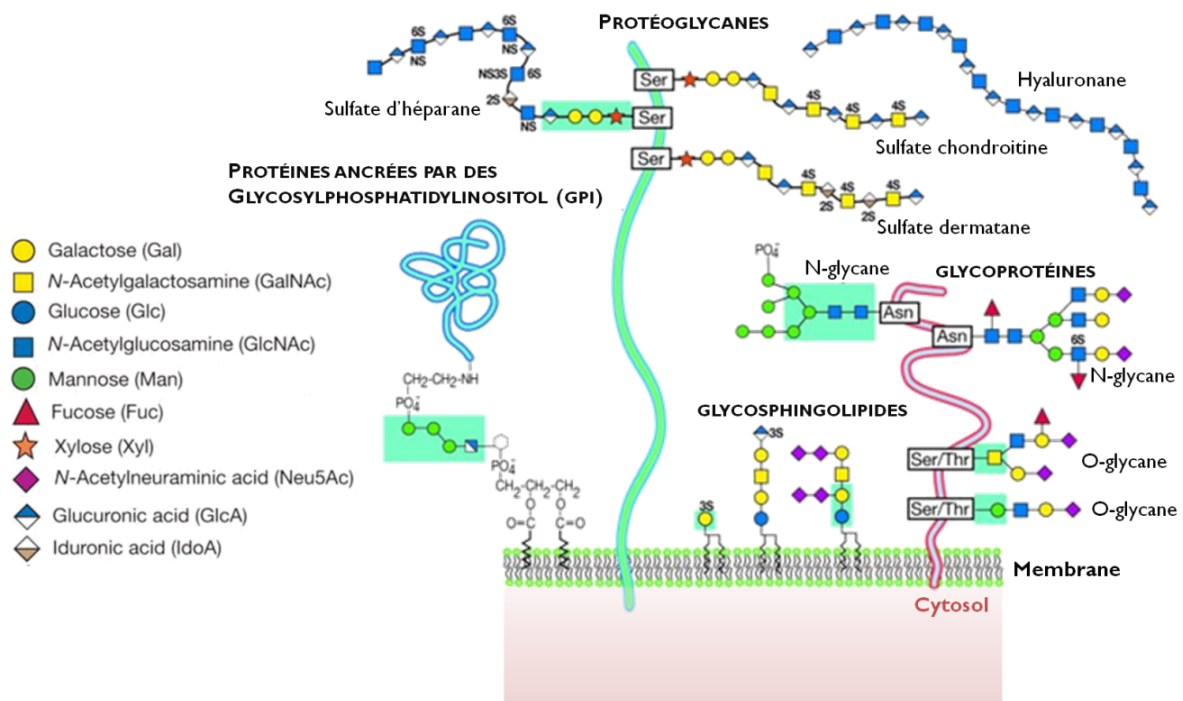
Les protéines amphitrophiques sont une nouvelle classe de protéines membranaires, qui ont été décrites dans les années 80 [20]. Elles sont définies comme des protéines qui peuvent passer d'un état périphérique à un état intégral. L'interaction membranaire de ces protéines est réversible et la protéine peut se trouver dans un état libre globulaire ou lié à la membrane. Ce changement d'état est dû à une modification conformationnelle de la protéine, induit par une phosphorylation, une acylation ou la fixation d'un ligand exposant un site de fixation à la membrane qui était auparavant enfoui dans la protéine.

### II. 3. Les sucres membranaires

En plus des lipides et protéines, un troisième composant entre en jeu dans la composition des membranes : les glucides. Ce sont des molécules très solubles en milieu aqueux qui ne possèdent pas de partie hydrophobe et ne sont donc jamais enfouis à l'intérieur de la membrane. Exclusivement présents du côté extracellulaire de la membrane plasmique, il est bien établi qu'ils n'ont pas de rôle direct dans la cellule mais une fonction indirecte comme la protection des protéines membranaires contre la protéolyse, la stabilité des protéines ou l'adhésion intercellulaire.

Les sucres de la membrane peuvent être soit des protéoglycanes (protéines liées à la membrane auxquelles sont attachés des glycosaminoglycanes), soit des sucres liés à des lipides (glycolipides) ou à des protéines (glycoprotéines) ; l'ensemble des glucides présents à la surface de la membrane est appelé le « glycocalyx » [21]. L'attachement des glucides aux protéines se nomme la glycosylation et peut se dérouler de façon co- ou post-traductionnelle.

Les protéoglycannes sont les plus importantes molécules du glycocalyx. Ce sont des protéines insérées dans la membrane liées à une ou plusieurs chaînes glycosaminoglycannes (GAGs) (Figure 9). Les GAGs sont des polysaccharides linéaires composés de disaccharides répétés, généralement un sucre amino-acétylé avec un acide uronique.



**Figure 9.** Principaux glycanes présents à la surface membranaire des cellules eucaryotes. D'après [22].



Il existe 5 types de chaînes GAGs chez les vertébrés : hyaluronane (HA), chondroïtine sulfate (CS), keratane sulfate (KS), dermatane sulfate (DS) et l'héparane sulfate (HS). La diversité des protéoglycanes de la membrane cellulaire met en évidence la diversité de leur fonctionnalité au sein de la membrane. Tous les processus cellulaires qui sont impliqués lors des interactions moléculaires à la surface de la membrane cellulaire mettent en jeu les protéoglycanes du fait de leur présence importante et leur facilité de fixation aux protéines. Ruoslahti et ses collaborateurs montrent par exemple l'importance des héparane sulfate de protéoglycanes (HSPGs) dans le processus de modulation des facteurs de croissance [23]. Deux familles majeures d'HSPGs existent : les glypicanes, attachés à des régions de la membrane cellulaire via une ancre GPI, et les syndecanes, protéines transmembranaires avec un domaine intracellulaire cytoplasmique [24].

Ces protéoglycanes se lient à une multitude de facteurs de croissance et des molécules de la matrice extracellulaire et sont impliqués dans de nombreux processus de transduction du signal qui régulent la forme et la prolifération cellulaire. La quantité et le type de protéoglycanes de la membrane peuvent être modulés en fonction de l'état de la cellule (prolifération, angiogenèse, apoptose, ...) [25; 26]. Ainsi, les HSPGs affectent les comportements cellulaires comme l'adhésion cellulaire, la mobilité ou la croissance.

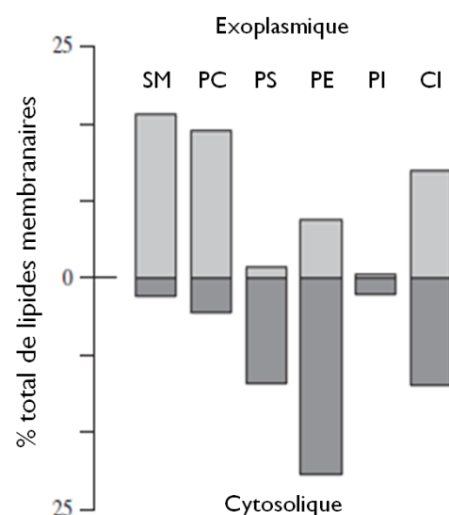
### **III. L'asymétrie membranaire**

Il apparaît aujourd'hui évident que les protéines et sucres de surface qui jouent un rôle bien particulier dans les membranes sont distribués de façon asymétrique dans la membrane selon leur fonction. Ceci était beaucoup moins évident pour le cas des lipides jusqu'en 1972 lorsque Mark S. Bretscher démontra que le PE et la PS n'étaient pas marqués par la [<sup>35</sup>S]-formylmethionylsulphonemethyl phosphate (FMMP; réactif de Bretscher) lors d'expériences de marquage des amines libres de ces lipides sur des erythrocytes intacts et des erythrocytes poreux. Ces expériences ont démontré que les PE et PS se trouvent uniquement du côté interne de la membrane [27; 28].

La première preuve de l'asymétrie membranaire des protéines est souvent attribuée à Humberto Fernandez-Moran qui montra, en 1964, la présence de ce qu'il appelait « particules élémentaires mitochondriales » sur la surface des membranes mitochondriales, grâce à des images de microscopie électronique, et qui est reconnu aujourd'hui comme la partie F1 de l'ATP-synthase [29].

Les lipides composés de choline (PC et SM) se situent majoritairement du côté externe de la membrane, tandis que les lipides avec une amine primaire (PE et PS) sont localisés principalement dans la membrane interne (Figure 10).

Les lipides de type PS sont entièrement localisés du côté interne de la membrane, ceci est dû à la présence d'une flipase dont la fonction est de s'assurer qu'il n'y a aucune PS sur le feuillet externe et de transporter sur le feuillet interne tous les PS qui le seraient potentiellement. Cependant, sur la surface membranaire des cellules en apoptose, la PS est surexprimée et permet à la cellule d'être reconnue par les macrophages. La PS agirait ainsi comme un signal de reconnaissance [30]. De plus, il a été montré récemment que les cellules cancéreuses surexpriment la PS sur le feuillet externe de la membrane [31; 32]. Ceci a notamment permis de montrer que l'asymétrie membranaire joue un rôle fonctionnel dans la cellule.



**Figure 10.** Distribution asymétrique des lipides dans la membrane. D'après [33].

### III. 1. La diffusion latérale

Un aspect important du modèle de mosaïque fluide proposé par Singer et Nicolson réside dans la fluidité et la dynamique des composants de la membrane.

La première preuve de la mobilité latérale membranaire ( $D_L$ ) a été apportée par les expériences d'immunofluorescence menées par Frye et Edidin en 1970 [34].

La vitesse de diffusion latérale des phospholipides ne dépend pas de la tête polaire des lipides mais de leur phase de transition membranaire ainsi que de la présence de cholestérol qui modifie l'état de la membrane [35; 36] (Figure 11).

D'une manière générale, la vitesse de diffusion latérale des lipides et des protéines dans les membranes biologiques est de l'ordre de  $10^{-9} \text{ cm}^2.\text{s}^{-1}$  tandis que dans les membranes synthétiques elle est environ 10 fois plus lente, de l'ordre de  $10^{-8} \text{ cm}^2.\text{s}^{-1}$ . Cette vitesse s'accroît de manière logique si la température augmente ou si la composition de la membrane la rend plus fluide [10].

### III. 2. La diffusion transversale (« Flip-flop »)

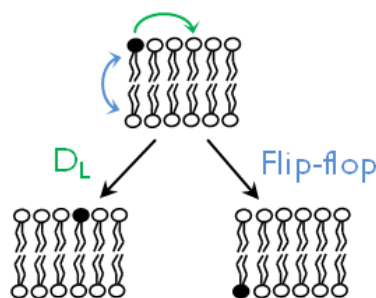
Les protéines membranaires et les sucres de surface diffusent de façon latérale dans la membrane mais non de façon transversale. L'asymétrie membranaire est principalement assurée par le « flip-flop » des lipides dans la membrane (passage d'un lipide d'un côté à l'autre de la membrane) (Figure 11).

Cependant, le passage d'un lipide à travers la membrane constitue un évènement très défavorable d'un point de vue thermodynamique. En effet, la partie hydrophobe est exposée à l'eau et la partie polaire se retrouve en contact avec le cœur hydrophobe de la membrane. Ce processus nécessite une énergie considérable mais peut être facilité à l'aide de protéines transmembranaires.

En 1972, Bretscher suggère la présence d'une protéine capable de faire basculer la PS du feuillet externe au feuillet interne, de manière à préserver l'asymétrie de PS et nomma cette protéine la « flippase » [27]. Plus tard, il a été montré que les floppases sont des protéines qui facilitent le mouvement des lipides du feuillet interne vers le feuillet externe (flop), les flippases se chargent de la translocation des protéines du feuillet externe au feuillet interne (flip) et les scramblases induisent la translocation des lipides dans les deux directions [37].

La vitesse de transfert de la diffusion transversale des protéines et des lipides est exprimée en  $t_{1/2}$  de transfert. Le  $t_{1/2}$  de transfert dans des membranes biologiques est de l'ordre de la seconde tandis que le  $t_{1/2}$  dans des membranes modèles est plutôt de l'ordre de l'heure. Les méthodes permettant de déterminer les cinétiques de flip-flop sont semblables à celles qui permettent d'identifier l'asymétrie membranaire [10].

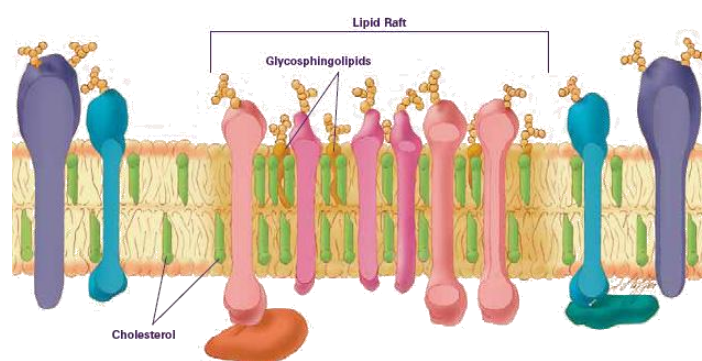
Le flip-flop des lipides et des protéines contribue à moduler l'asymétrie membranaire de la cellule, ce mécanisme est ainsi utilisé tel un processus de signalisation cellulaire lorsque la cellule entre en état d'apoptose et exprime le PS sur le feuillet externe de la membrane, le PS est reconnu par les macrophages et entraîne la destruction de la cellule [30; 32].



**Figure 11.** Diffusion des lipides dans la membrane. Diffusion latérale,  $D_L$  ; Flip-flop des lipides

#### IV. L'hétérogénéité membranaire : les radeaux lipidiques

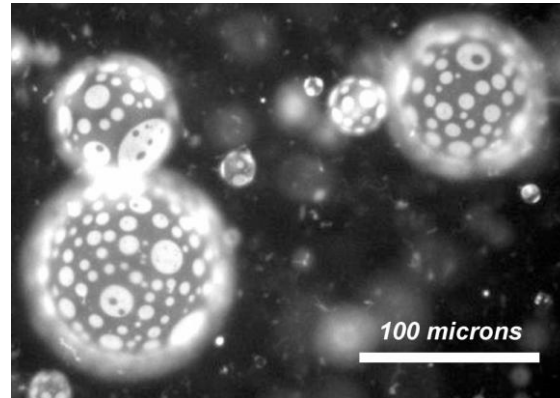
Les radeaux lipidiques (« rafts ») sont décrits comme des sub-domaines de la membrane plasmique, relativement petits (de 1 nm à 1  $\mu$ m), distincts et en phase liquide ordonnée (Lo). Ils se forment et se dispersent rapidement, en raison de la présence des chaînes alkyl saturées et des liaisons hydrogènes intermoléculaires formées avec les sphingolipides (les rafts possèdent une température de transition si élevée qu'ils ont tendance à se séparer naturellement des phosphoglycérolipides qui sont, eux, plus mobiles) [8] (Figure 12; Figure 13).



**Figure 12.** Représentation schématique des rafts dans les membranes. D'après [38].

La diffusion latérale dans la phase Lo est très faible, et quasiment équivalente à celle d'un état liquide cristallin. De plus, les domaines membranaires riches en cholestérol ont tendance à être plus épais à cause de la présence de cholestérol dans la membrane.

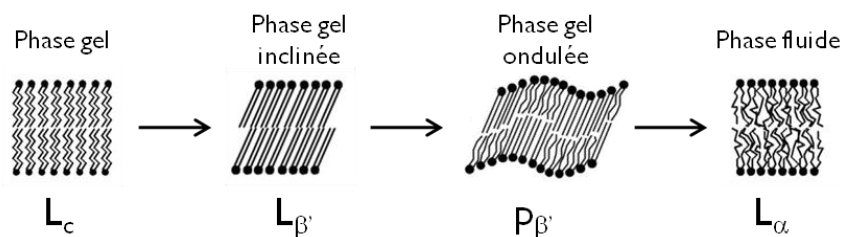
Les « rafts » fournissent des plateformes lipidiques permettant de co-localiser les composants nécessaires à une fonction cellulaire donnée telle que le transport de nutriments ou la signalisation cellulaire. Les radeaux lipidiques peuvent être de 2 types : planaires ou de forme invaginée, qui constituent les cavéoles. Les composants des rafts sont souvent étudiés en extrayant des échantillons biologiques par l'utilisation de détergents tels que le Triton X-100 et par l'analyse des protéines et lipides qui résident dans la partie insoluble. Ces composants membranaires sont ainsi souvent nommés par cette propriété comme des « membranes résistantes aux détergents » ou des « membranes résistantes au Triton ».



**Figure I3.** Différences de phases lipide/cholestérol observées dans des vésicules géantes par microscopie de fluorescence. D'après [39].

## V. Les membranes : un assemblage lipidique à géométrie variable

La préférence d'un lipide pour une phase particulière guide le polymorphisme des membranes. Les lipides forment spontanément différentes structures en fonction de leurs têtes polaires, degré d'insaturation, température de transition, taux d'hydratation, etc. Ils peuvent se structurer avec un taux d'hydratation élevé et similaire au milieu biologique en phase lamellaire, micellaire ou inversée mais seule la phase lamellaire existe de façon presque exclusive en milieu biologique. La phase lamellaire se trouve sous différents états :  $L_c$  (état gel),  $L_{\beta'}$  (état gel incliné),  $P_{\beta'}$  (état gel ondulé),  $L_{\alpha}$  (état fluide) (Figure I4).



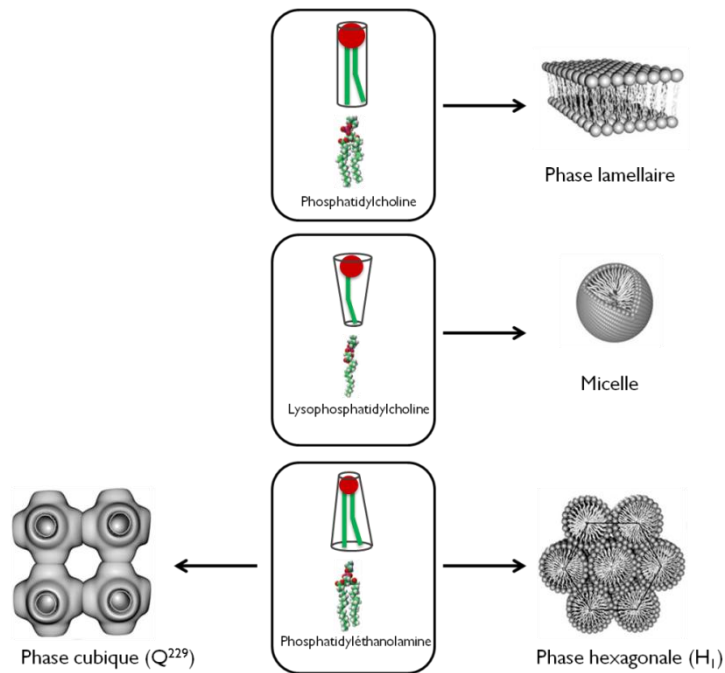
**Figure I4.** Les différentes phases lipidiques.

Les phases qu'adoptent les lipides dépendent principalement de leur forme géométrique. Les membranes biologiques sont composées d'une grande variété de lipides qui peuvent adopter trois formes basiques : un cône tronqué, un cylindre et un cône inversé. Les lipides cylindriques (la phosphatidylcholine, ...) préféreront la phase lamellaire tandis que les autres lipides (la phosphatidyléthanolamine, ...) adopteront d'autres phases non-lamellaires (Figure 15).

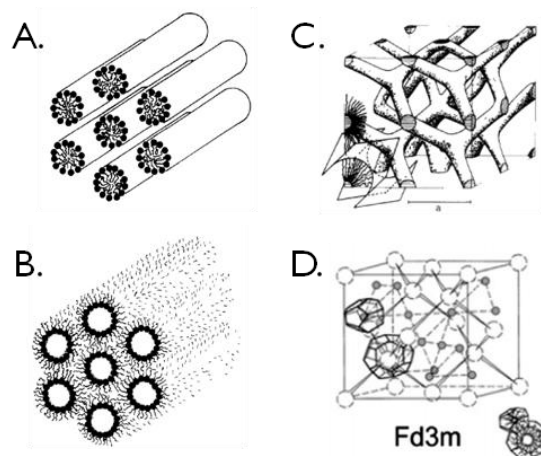
Ces phases peuvent varier selon la longueur du squelette carboné du lipide, de son degré d'insaturation et de la tête polaire ou des conditions du solvant aqueux (température, force ionique, taux d'hydratation, pH, pression...). Les lipides peuvent coexister en phase gel ou fluide. La température correspondant au passage d'un état à l'autre est appelée température de transition de phase. Différentes techniques permettent d'étudier ces transitions de phase comme la Calorimétrie Différentielle à Balayage (DSC), la Résonance Magnétique Nucléaire (RMN), la Résonance Paramagnétique Electronique (EPR) ou la spectroscopie de fluorescence.

Lorsque le cholestérol est inséré dans les membranes, il induit des changements d'états de la bicouche : la phase liquide désordonnée ( $L_d$ ) et la phase liquide ordonnée ( $L_o$ ). L'état  $L_o$  se comporte entre la phase gel ( $L_{\beta'}$ ) et la phase liquide ( $L_{\alpha}$ ) et possède les mêmes propriétés que ces phases. Dans l'état  $L_o$ , les chaînes acyles des lipides sont étendues et se comportent ainsi comme un état gel. Le paramètre d'ordre des lipides de cet état est aussi élevé que celui de l'état gel tandis que la mobilité translationnelle des lipides est similaire à celle des lipides en phases fluide.

Il a été montré que les phases cubiques et hexagonales peuvent aussi intervenir en milieu biologique mais seulement lors d'un état transitoire, comme la fusion, la fission ou la formation de pore [40; 41].



**Figure 15.** Structure des lipides membranaires majoritaires, avec leur forme plus ou moins cylindriques. La PC est cylindrique tandis que la PE avec sa petite tête polaire et sa forme conique crée une tension de la membrane et a tendance à induire une courbure négative. Les lipides avec une seule chaîne d'acides gras sont des détergents et forment un cône inversé, qui crée une formation en micelle.



**Figure 16.** Les phases hexagonales et cubiques. A. Phase hexagonale  $H_I$  ; B. Phase hexagonale inversée  $H_{II}$  ; C. Phase cubique  $Q^{224}$  ; D. Phase cubique  $Q^{227}$ . D'après [41].



Les phases cubiques  $Q^{224}$  et  $Q^{227}$  sont les phases cubiques parmi les plus stables dans un excès d'hydratation qui est similaire à celui du milieu biologique (Figure 16).

La phase  $Q^{227}$  possède deux propriétés qui tendent à faire penser qu'elle pourrait exister en milieu biologique : d'une part, cette phase est composée de lipides très communs aux membranes biologiques (PC, PE) et d'autre part, l'eau est présente à un taux élevé avec la présence d'un continuum 3D apolaire [40; 42].

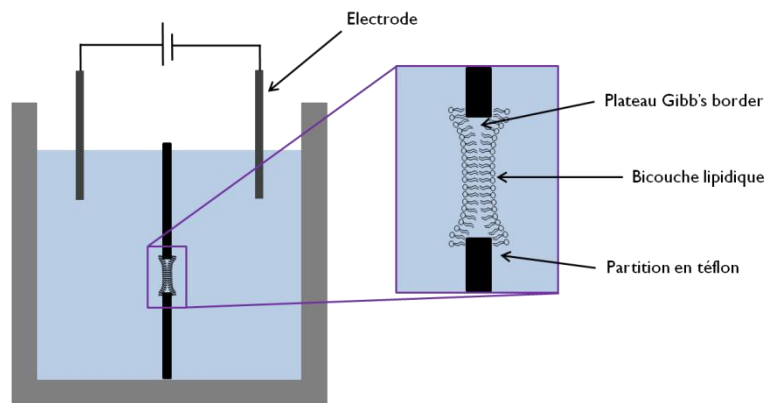
Des études sur les interactions entre CPPs et membranes modèles ont même démontré la formation de phases cubiques comme un mécanisme d'interaction membranaire de CPPs déclenchant leur internalisation cellulaire [43; 44].

## **VI. Mimer la complexité biologique des membranes**

Les lipides ont la propriété remarquable de s'arranger en bicouche lorsqu'ils sont placés dans un environnement aqueux. Dans une bicouche, les molécules s'alignent de manière à ce que la tête polaire soit orientée vers la phase aqueuse et la partie hydrophobe protégée à l'intérieur de la bicouche excluant l'eau de cette partie.

Les membranes cellulaires, leur composition et leurs fonctions sont nombreuses ce qui rend la compréhension des phénomènes membranaires compliquée. Pour cette raison de nombreux modèles de simplification ont été développés afin de les mimer. Le modèle le plus simple et le premier à être décrit est celui d'une monocouche supportée de lipides (Figure 20A) et la première bicouche supportée a été décrite par Mueller en 1962 [45].

Ce modèle est appelé Bilayer Lipid Membrane (BLM ou « Bimolecular Lipid Membrane » ou « Black Lipid Membrane ») (Figure 17). Cette dernière désignation est due aux interférences destructives lorsqu'elle est observée avec une lumière incidente de  $90^\circ$ .



**Figure 17.** Formation des "Black Lipid Membranes"

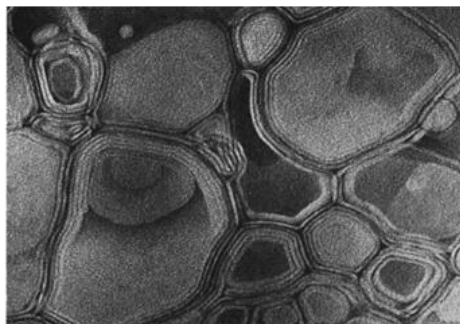
Pour former une BLM il suffit de dissoudre les lipides dans un solvant hydrocarboné et « peindre » une petite ouverture au milieu d'une surface (~2 mm de diamètre) qui sépare deux compartiments aqueux. Ces bicouches sont plus particulièrement utilisées par les électrophysiologistes car elles permettent de mesurer un potentiel à travers la membrane. Très utiles pour les mesures de potentiel transmembranaires, les BLM sont cependant sensibles aux vibrations et très fragiles.

Les protéines transmembranaires se dénaturent souvent à l'interface air-eau et l'étude des flux transmembranaires est ainsi compliquée.

La réalisation d'un modèle plus réaliste et rigoureux qui permettrait la reconstitution de protéines intégrales était donc nécessaire et cela a pris la forme de vésicules sphériques plus communément appelés les liposomes.

### VI. I. Les liposomes

La découverte des liposomes est attribuée à Alec D. Bangham pour son étude publiée en 1964 mais le nom de « liposomes » n'est apparu que quelques années plus tard avec G. Weissman et G. Sessa [46; 47].



**Figure I 8.** Sphérules phospholipidiques observées par Sessa & Weissmann par microscopie électronique [47].

Il existe deux types de liposomes : les liposomes multi-lamellaires et les liposomes unilamellaires. Les liposomes multi-lamellaires sont les Vésicules Grandes Multi-lamellaires (MLVs) et parmi les liposomes unilamellaires, il existe trois types de liposomes classés en fonction de leur taille : les Petites Vésicules Unilamellaires (SUVs), les Grandes Vésicules Unilamellaires (LUVs) et les Vésicules Géantes Unilamellaires (GUVs).

#### VI.1.1. Les Vésicules Multi-Lamellaires (MLVs)

Les vésicules multi-lamellaires sont des objets comparables à une superposition de bicouches ressemblant à la conformation oignon et de taille variable entre 0.5 et 1  $\mu\text{m}$ . Elles sont préparées de manière simple en dissolvant les lipides dans un solvant aqueux. Leur principal inconvénient réside dans le fait que l'on ne maîtrise ni leur taille ni leur lamellarité et il semble possible qu'une forte proportion de lipides soit séquestrée à l'intérieur des vésicules. Ceci limite l'espace disponible au sein des vésicules et ne permet pas de déterminer précisément la concentration de lipides présents à la surface des vésicules. L'utilisation de vésicules unilamellaires est donc plus avantageuse.

#### VI.1.2. Les Petites Vésicules Unilamellaires (SUVs)

Les SUVs sont des vésicules de petite taille d'environ 25 nm de diamètre. Ces vésicules sont formées par extrusion, sonication ou gel filtration des MLVs.

La partie externe de la membrane est constituée d'environ 2/3 des lipides et le tiers restant constitue la partie interne de la bicouche. De plus, le rayon de courbure élevé des SUVs rend ce modèle membranaire peu comparable aux membranes cellulaires. Cela les rend instables et favorise la fusion de ces vésicules créant des vésicules plus larges (LUVs). Cependant, cette instabilité peut être très utile notamment pour la formation de bicouches supportées.

### VI.1.3. Les Vésicules Grandes Unilamellaires (LUVs)

Les LUVs sont formées à partir de MLVs par extrusion à travers une membrane poreuse dont la taille des pores est maîtrisée ou par sonication. La taille des pores peut varier entre 30 nm et 1  $\mu\text{m}$  formant ainsi des LUVs de cette gamme de tailles. Plus la taille des LUVs augmente, plus le ratio de lipides entre l'intérieur et l'extérieur de la bicouche se rapproche de 1 (Tableau 2).

De par leur stabilité, les LUVs sont souvent utilisées pour les études spectroscopiques, mais aussi grâce à leur conformation qui mime beaucoup mieux la membrane cellulaire. De plus, grâce à ce modèle il est possible de réaliser des liposomes de composition lipidique variée.

Diamètre (nm)	Ratio IM/OM (ratio molaire)	Volume interne ( $\mu\text{L}/\mu\text{mol}$ de PL)	Nb de PL/vésicules	Nb de vésicules / $\mu\text{mol}$ lipides
25	0,46	0,3	$4,8 \cdot 10^3$	$1,3 \cdot 10^{14}$
100	0,85	2,5	$9,7 \cdot 10^4$	$6,2 \cdot 10^{12}$
500	0,97	15	$2,6 \cdot 10^6$	$2,3 \cdot 10^{11}$

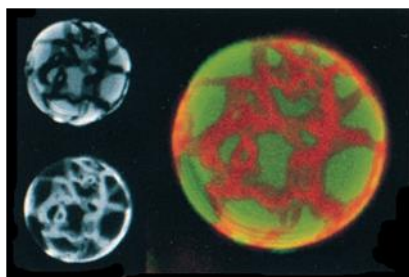
**Tableau 2.** Quelques caractéristiques des LUVs (de 100 à 500 nm) et des SUVs (de 25 nm). IM, Monocouche lipidique interne, OM, Monocouche lipidique externe, PL, phospholipides. Les calculs ont été réalisés avec une épaisseur de bicouche de 4 nm et une surface par molécules de lipides de  $0,6 \text{ nm}^2$ . D'après [10].

#### VI.1.4. Les Vésicules Unilamellaires Géantes (GUVs) et les Vésicules de Membranes Plasmiques Géantes (GPMVs)

Les GUVs ont une taille de l'ordre du micromètre (entre 10 et 100  $\mu\text{m}$ ) et sont des modèles membranaires qui miment efficacement la membrane cellulaire grâce à leur rayon de courbure comparable à celui d'une cellule.

Ces modèles membranaires sont utiles pour étudier les propriétés physiques, mécaniques et électriques des bicouches lipidiques par leur observation en microscopie optique. Leur préparation peut se réaliser de deux manières : par hydratation douce ou par électroformation [48]. L'hydratation douce requiert la présence d'un petit pourcentage de lipides négativement chargés mais le rendement de formation des GUVs est souvent variable et parfois très faible. Au contraire, l'électroformation produit des rendements importants mais peut mener à la formation de produits d'électrolyse délétères.

Les GUVs ont été largement utilisées pour l'étude des comportements de phase des membranes composées de cholestérol et notamment pour la compréhension des micro-domaines membranaires. La spectroscopie de corrélation de fluorescence (FCS) a permis de montrer l'existence de coexistence de phase dans les membranes de GUVs [49] (Figure 13; Figure 19).



**Figure 19.** Démonstration des coexistences de phase par microscopie confocale dans des GUVs composées de lipides en phase fluide (DLPC ; en vert) et de lipides en phase ordonnée (DPPC ; en rouge) avec un ratio DLPC:DPPC 40:60. Image tirée de [49].

Les Vésicules de Membranes Plasmiques Géantes (GPMVs), ou "blebs", de tailles micrométriques, représentent un modèle membranaire plus réaliste et plus naturel que les GUVs car ils correspondent à des protubérances de la membrane plasmique et leur composition membranaire est par conséquent identique à celle de la cellule "mère". La formation de GPMVs ("vésiculation" ou "blebbing") est induite naturellement au cours de la mort cellulaire, de la division cellulaire mais peut aussi être induite par un stress physique ou chimique (stress osmotique ou ajout de formaldéhyde ou de DTT) [50; 51].

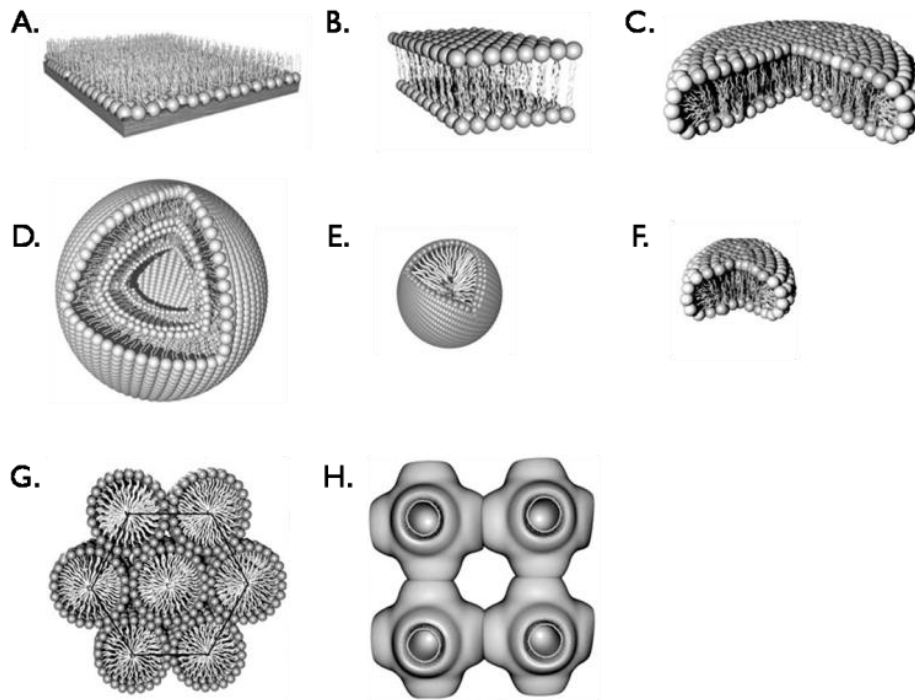
### VI. 2. Les micelles et bicelles

Les micelles constituent le premier assemblage formé par des détergents. Ce sont des agrégats disjoints composés d'un petit nombre de molécules (<100) intégré dans une matrice de polarité opposée.

Les micelles sont composées d'une monocouche de lipides qui crée une sphère de lipides orientés avec un cœur hydrophobe et une surface polaire (Figure 20E). La concentration micellaire critique (CMC) définit la concentration à laquelle les lipides s'assemblent pour passer de l'état monomérique à l'état micellaire. La compréhension des interactions lipide-détergent est importante pour l'étude de l'isolation des protéines membranaires.

Les bicelles sont des mélanges de lipides et détergents, découverts dans les années 80 par Gabriel et Roberts [52; 53]. Ce sont des vésicules aplaties en forme de « camembert », de petite taille (~40 nm de diamètre) pour des bicelles isotropes ou de grande taille (~500 nm de diamètre) pour des bicelles anisotropes (Figure 20F). L'anisotropie de ces objets présente des avantages pour leur utilisation dans certaines techniques.

Par exemple, les bicelles anisotropes s'orientent dans un champ magnétique et peuvent donc être utilisés en RMN. Elles présentent l'avantage de posséder une partie de leur surface plane, qui peut facilement être assimilée à la courbure des membranes cellulaires.



**Figure 20.** Différentes géométries d'assemblage lipidique. **(A)** Monocouche de Langmuir à l'interface air-eau, **(B)** Bicouche lipidique, **(C)** Bicelle anisotrope, **(D)** Liposome multilamellaire, **(E)** Micelle, **(F)** Bicelle isotrope, **(G)** Phase hexagonale H<sub>1</sub>, **(H)** Phase cubique Q<sup>229</sup>. Adapté de [54]

### **MESSAGE A RETENIR**

- Trois types de lipides membranaires sont les plus répandus dans les membranes naturelles : les phospholipides, les sphingolipides et les stérols ;
- Trois types de composants principaux dans la membrane : les lipides, les protéines et les sucres membranaires ;
- Le modèle de membrane aujourd'hui communément accepté est celui de la mosaïque fluide avec la présence de domaines lipidiques ("rafts") ;
- Les lipides et certaines protéines membranaires peuvent diffuser rapidement dans la membrane ;
- La diversité de composition des membranes leur confère un rôle structural et fonctionnel ;
- L'hétérogénéité des membranes permet la création de plateformes fonctionnelles impliquées dans de nombreux processus cellulaires ;
- Des modèles membranaires (monocouche, bicouche, liposome, ...) sont couramment utilisés afin de mimer les membranes cellulaires.







# CHAPITRE II

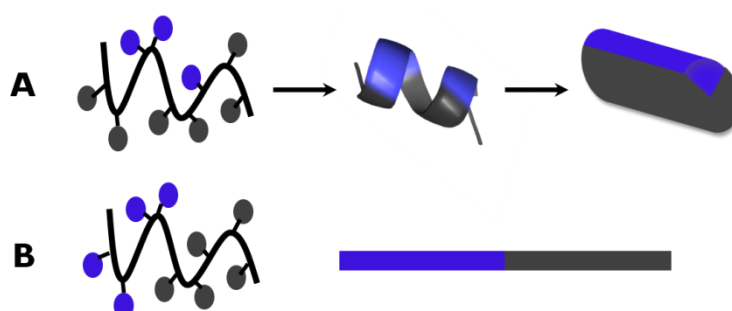
## **LES PEPTIDES VECTEURS : « CELL-PENETRATING PEPTIDES »**



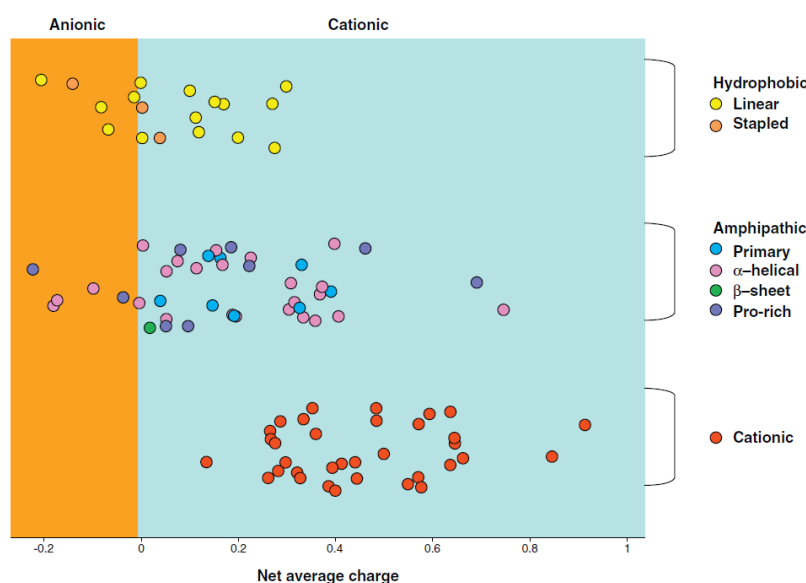
## I. Origine et classification des CPPs

La première découverte d'un peptide polycationique capable de traverser les membranes plasmiques des cellules a été publié en 1965 [55] mais ce n'est qu'en 1988 que le potentiel de cette nouvelle classe de molécules, appelés Cell-Penetrating Peptides (CPPs), « Protein Transduction Domain » (PTDs) ou aussi nommés « Peptides de Troie » a été mis en évidence [56; 57].

Les CPPs ou peptides vecteurs sont de petites molécules, en général de taille inférieure à 30 acides aminés. De nature cationique, ils possèdent souvent un caractère amphipathique (Figure 22). Ils sont habituellement classés en fonction de leur origine et ils peuvent être soit dérivés de protéines naturelles, chimériques ou synthétiques. Je présente ici une classification des CPPs en fonction de leur origine et quelques exemples de CPPs les plus connus et les plus utilisés, mais ils peuvent aussi être classés en fonction de leur caractéristiques physico/chimiques. Par exemple, ils peuvent être amphipathiques, hydrophobes ou cationiques (Figure 22). Comme le montre la Figure 22, les CPPs sont majoritairement structurés en hélice  $\alpha$ , et dans ce cas leur amphipathicité peut être primaire ou secondaire (Figure 21). Lorsqu'un CPP est amphipathique primaire, cela signifie que son amphipathicité découle de sa structure primaire. Une amphipathicité secondaire signifie que l'amphipathicité du peptide est induite par sa structure secondaire avec un côté de la structure secondaire hydrophobe et l'autre côté hydrophile.



**Figure 21.** Représentation schématique de l'amphipathicité secondaire **(A)** et de l'amphipathicité primaire **(B)** des peptides vecteurs.



**Figure 22.** Classification des CPPs en fonction de leurs caractéristiques physico/chimiques. D'après [58].

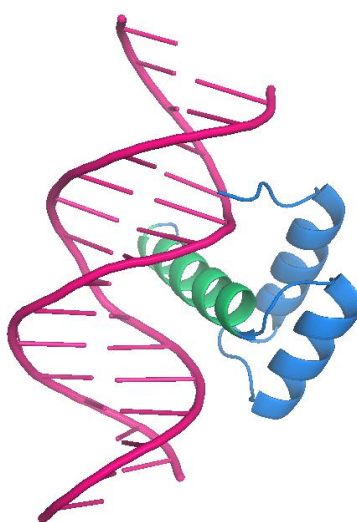
## I. I. Peptides dérivés de protéines

La plupart des découvertes importantes de ce monde sont mises au jour par hasard ou par intuition. C'est ainsi que Alan D. Frankel et Carl O. Pabo découvrent en 1988 que la protéine Tat (pour Trans-Activateur de la Transcription) du virus de l'immunodéficience humaine (VIH-I), impliquée dans la réplication de ce virus, peut être internalisée dans les cellules eucaryotes et atteindre leur noyau et ainsi activer le promoteur du VIH-I [57]. La même année Maurice Green et Paul M. Loewenstein identifient plusieurs régions essentielles de la protéine, indispensables à sa liaison à l'ADN et à la trans-activation du promoteur du VIH-I [56]. Ces résultats ont soulevé de nombreuses questions et notamment celle du mode de transport de ces protéines. A cette époque, cela semblait inconcevable qu'une protéine ou un peptide puisse être transporté aussi rapidement et efficacement dans des cellules en raison de la faible perméabilité de la membrane cellulaire vis-à-vis de ces molécules. Ce n'est qu'en 1997 que l'équipe de Bernard Lebleu identifie la séquence minimale d'acides aminés responsable de l'internalisation de la protéine Tat [59].

En 1991, le groupe d'Alain Prochiantz découvre que l'homéodomaine de l'homéoprotéine *Antennapedia Drosophila*, est également capable de traverser les membranes des cellules neuronales, d'atteindre leur noyau et d'activer leur différenciation morphologique [60].

Les homéoprotéines définissent une classe de facteur de transcription qui se lie à l'ADN grâce à une séquence de 60 acides aminés, appelée l'homéodomaine. Cette séquence est hautement conservée parmi les homéoprotéines de différentes espèces et se compose de trois hélices  $\alpha$  dont la 3<sup>e</sup> hélice est responsable de la liaison de l'homéoprotéine à l'ADN.

Pour mieux comprendre l'internalisation de l'homéodomaine de *Drosophila Antennapedia*, sa séquence a été modifiée par mutagenèse dirigée et il a été montré que les 16 résidus (43-58) correspondant à la 3<sup>e</sup> hélice de l'homéodomaine sont responsables de l'internalisation de la protéine (Figure 23) [61]. Ces 16 résidus forment un peptide, appelé la pénétratine (pAntp), qui possède les mêmes propriétés que la protéine entière en termes d'internalisation.



**Figure 23.** Structure de la protéine de l'homéodomaine de *Drosophila Antennapedia* (bleu) en complexe avec l'ADN (rose). L'hélice III correspondant aux résidus 43-58 est représentée en vert. Structure pdb 9ANT, d'après [62].

Des études ont montré que l'internalisation de la pénétratine se déroule à 37°C mais aussi à 4°C, température à laquelle l'endocytose est inhibée et démontrant ainsi que l'internalisation est énergie-indépendante. De façon surprenante, l'absence de saturation du processus d'internalisation indique que celle-ci n'est pas dépendante d'un récepteur membranaire [63]. Derossi et ses collaborateurs ont démontré que l'internalisation est non seulement récepteur-indépendante, mais aussi que les changements conformationnels du peptide en présence de membranes ne sont pas nécessaires pour son internalisation [63].

Enfin, la substitution des deux Trp par des phenylalanines (Phe) montre que l'amphipathicité du peptide n'est pas suffisante pour son internalisation [61].

D'autres CPPs peuvent être dérivés de protéines transmembranaires. Par exemple, le peptide pVec, composé de 18 acides aminés, dérive d'une protéine d'adhésion cellulaire : la cadhérine. Les cadhérines sont des glycoprotéines trans-membranaires longues de 700 acides aminés, classées en fonction du tissu d'où elles proviennent. Le peptide pVec provient de la Cadrine Endothéliale Vasculaire. Dans sa fonction de contact physique, la VE-cadrine ne sert pas seulement de colle intercellulaire entre les cellules adjacentes mais aussi dans la transmission des informations venant de l'extérieur de la cellule et dans le contrôle de la perméabilité vasculaire et l'angiogenèse. L'internalisation efficace, énergie- et récepteur-indépendante du peptide pVec a été vérifiée pour différentes lignées cellulaires et il a été prouvé que ce peptide pouvait transporter des cargaisons efficacement [64].

## I. 2. Peptides chimériques

Les peptides chimériques sont des peptides nés de la fusion de deux séquences de peptides naturels et/ou synthétiques.

Un représentant important de cette classe de peptides se nomme le transportan, décrit en 1996 par Langel et ses collaborateurs [65]. C'est un CPP de 27 acides aminés composé des 12 résidus en N-Terminal du neuropeptide galanine lié par une lysine (Lys) aux 14 acides aminés du venin de la guêpe mastoparan. La partie N-terminale du peptide est rendue plus hydrophobe améliorant ainsi sa proximité avec la membrane. La galanine et le mastoparan possèdent tous deux des activités biologiques différentes. Par exemple, le mastoparan entraîne l'activation de la phospholipase C et A2, l'inhibition de la  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase rénale et synaptosomale tandis que la galanine module la libération d'insuline et inhibe la sécrétion d'acétylcholine [65]. Il a été montré que le transportan pouvait être internalisé en moins de 5 minutes dans des cellules de fibroblastes et transporter de larges cargaisons. Le transportan a ainsi donné lieu à la synthèse de nombreux dérivés dont le plus efficace est le transportan10 (TP10) qui a été largement étudié et utilisé en tant que peptide vecteur [66].



Un autre exemple de peptide chimérique est le peptide amphipatique primaire Pep-I. Ce peptide est composé de 21 résidus et constitué de 3 domaines : un domaine hydrophobe riche en résidus Trp, un domaine hydrophile riche en Lys et dérivant de la séquence de localisation nucléaire (NLS) de l'antigène-T SV40 et un domaine central liant les 2 domaines précédents contenant une proline (Pro) qui augmente la flexibilité et la stabilité du peptide [67]. Il a été démontré que Pep-I est un peptide vecteur efficace dans le transport de protéines et de peptides, sans subir de dégradation endosomale [68].

Enfin, le peptide MPG est dérivé du peptide de fusion gp41 du VIH-1 et de la séquence de localisation nucléaire de l'antigène-T SV40. Il a été montré que lorsque le peptide MPG est mixé avec des oligonucléotides, ces deux molécules s'assemblent rapidement pour former un complexe non-covalent grâce à des interactions principalement électrostatiques. Ces interactions mettraient en jeu les charges positives de la partie riche en Lys du peptide vecteur et les charges négatives des phosphates des acides nucléiques. Ce complexe est ensuite efficacement et rapidement internalisé dans les noyaux des cellules (en moins d'une heure) [69-71].

### I. 3. Peptides synthétiques

La présence d'un nombre important de résidus cationiques dans la séquence d'acides aminés du peptide Tat (6 résidus arginines (Arg) et 2 Lys sur 13 résidus) a permis d'identifier leur importance dans la séquence des CPPs. Les recherches menées au sein du groupe de Wender ont notamment permis d'identifier un nombre optimal d'Arg nécessaire à l'internalisation cellulaire pour améliorer l'efficacité des CPPs [72].

Dans le but de diminuer au maximum les coûts de production et de réduire les risques de dégradation et de toxicité du peptide, le peptide le mieux internalisé et le plus court a été synthétisé : l'oligoarginine R9. Lorsque le nombre d'Arg est supérieur à 9, le taux d'internalisation cellulaire des oligoarginines décline rapidement [73].

Grâce à des études de structure-activité sur la pénétratine, couplées à ces études sur R9, les peptides RW16 et RW9 ont été conçus par Chassaing et collaborateurs et font l'objet d'une étude approfondie au cours de cette thèse. L'état de l'art concernant ces peptides sera décrit dans la partie III.

Le peptide CADY est un peptide synthétique composé de 20 résidus, amphipatique et dérivé du peptide chimérique PPTGI. CADY a été conçu de manière à augmenter l'interaction du peptide PPTGI avec les siRNA ainsi que sa capacité à interagir avec la partie hydrophobe de la membrane [74]. Sept résidus ont été mutés en Arg et en Trp. Il possède en plus une amide en C-terminal et il est acétylé en N-terminal améliorant ainsi sa capacité d'internalisation ainsi que sa stabilité lorsqu'il est complexé avec une cargaison de type siRNA.

Le peptide modèle amphipathique (MAP), peptide composé de leucine (Leu), Lys, et alanine (Ala), est destiné à être entièrement amphipathique lorsqu'il est structuré en hélice  $\alpha$ . Il a été montré que MAP s'internalise à travers un mécanisme non-endocytotique et dépendant de son amphipathicité, ce qui venait contredire les résultats de Derossi sur la pénétratine [61; 75].

	CPPs	Origines	Séquences	Cargaisons	Références
<b>Peptides dérivés de protéine</b>	Tat	Protéine Tat du VIH-I	YGRKKRRQRRR	Protéine/peptide/ siRNA/ liposome/nanoparticule	[76; 77]
	Pénétratine	Homéodomaine Drosophila Antennapedia	RQIKIYFQNRRMKWKK	Protéine/peptide/PNA/ siRNA/liposome	[60; 78]
	pVEc	Cadhérine (vasculaire endothéliale)	LLIILRRRIRKQAHASK	Protéine/peptide/PNA	[64]
<b>Peptides chimériques</b>	Transportan	Galanine + Mastoparan	GWTLSAGYLLG-K- INLKALAALAKKIL	Protéine/PNA/siRNA	[66]
	MPG	HIV Gp41 + SV40 NLS	GALFLGFLGAAGSTMGAWSQPKK KRKV	siRNA/ODN/plasmide	[71]
	Pep-I	Motif riche en Trp + SV40 NLS	KETWWETWWTEWSQPKKKRKV	Protéine/peptide	[70]
<b>Peptides synthétiques</b>	Oligoarginine	Dérivé de Tat	R <sub>n</sub> : 6 < n < 12	Protéine/peptide/ siRNA/ODN	[72; 73]
	CADY	Dérivé de PPTGI	Ac-LWRALWRLRLSLWRLWRA- cystéamide	siRNA	[74]
	MAP	Peptide amphipatique modèle	KLALKLALKALKALKLA-NH <sub>2</sub>	siRNA	[75]

**Tableau 3.** Quelques CPPs d'origines différentes et quelques cargaisons étudiées avec ces peptides.

## **II. Les fonctions des CPPs : des agents triples ?**

### **II. I. Le transport intracellulaire de molécules d'intérêt**

#### **II.I.I. Quels types de cargaisons ?**

Habituellement, l'utilisation de polypeptides ou d'oligonucléotides est limitée en thérapeutique à cause de leur faible perméabilité à la membrane et à leur dégradation rapide. Cela représente un obstacle pour la recherche biomédicale dans le domaine de libération de substances médicamenteuses dans l'organisme. Le grand intérêt développé ces dernières années pour les CPPs s'explique par le fait qu'ils ont la capacité de transporter des cargaisons de compositions et de tailles très variées du milieu extracellulaire au milieu intracellulaire. Par exemple, le peptide Tat peut transporter des protéines de 100 kDa, des nanoparticules de 40 nm et même des liposomes de 200 nm [76]. Ainsi la découverte de petites molécules pouvant traverser les membranes d'une manière récepteur- et énergie-indépendante et transporter des cargaisons de tout type (peptides, protéines, oligonucléotides, nanoparticules, ...) sans détruire les cellules cibles, a ouvert de nouvelles voies pour la recherche biomédicale.

Une des premières preuves de concept de l'application *in vivo* de ces peptides vecteurs pour la libération de petits peptides ou de larges protéines dans différentes lignées cellulaires fut proposée par le groupe de Langel avec le transportan en 1998 puis par le groupe de Dowdy en 1999 avec le peptide Tat [66; 79].

Les CPPs ont la capacité de transporter de grosses protéines comme des anticorps, ou des acides nucléiques type siRNA, ADN, ARN, ainsi que des médicaments dérivés de peptides ou de petites molécules. Ils peuvent aussi transporter des molécules pour l'imagerie comme des quantum dots, des fluorophores (type GFP), des marqueurs radioactifs ou des agents de contrastes pour l'imagerie par résonance magnétique (IRM) [80-82].

### II.1.2. Quelle liaison entre la cargaison et le CPP ?

La liaison entre le peptide vecteur et le cargo doit maintenir la capacité du complexe à traverser les membranes ainsi que préserver l'activité biologique de la molécule transportée dans la cellule.

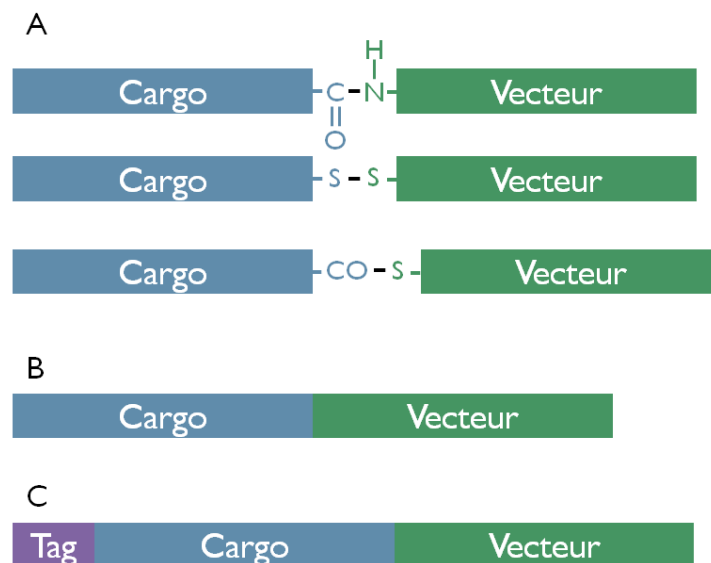
Le mode de liaison du couple CPP-cargaison est principalement guidé par la nature de la molécule transportée, l'accessibilité de la synthèse et l'efficacité biologique du complexe. La synthèse chimique peut être réalisée en tandem ou le complexe peut être produit par recombinaison génétique chez *E. Coli* qui exprime une protéine de fusion (Figure 24).

- Liaison chimique covalente avec la cargaison

Le cargo peut être relié au peptide vecteur via une liaison amide (liaison peptidique) entre une fonction carboxylique libre et une amine après activation. Cette réaction peut s'appliquer sur une amine N-terminale ou bien en position  $\epsilon$  de la chaîne latérale d'une Lys. Cette liaison est chimiquement stable et souvent utilisée pour relier le peptide vecteur à une cargaison de nature peptidique (peptide ou PNA) [83]. Les liaisons CPP-cargaisons peuvent être de type pont disulfure grâce à des fonctions thiol. C'est la méthode de couplage CPP-cargaison la plus utilisée de par sa facilité de couplage et de clivage intracellulaire. Elle est clivée après l'internalisation du conjugué à l'intérieur des cellules ou dans les vésicules d'endocytose grâce au milieu réducteur du cytoplasme et de l'activité des enzymes oxydo-réductrices de la cellule [84; 85]. Les groupements thiols peuvent également former une liaison thioéther par addition nucléophile sur un groupe maléimide mais ce lien thioether n'est pas clivable dans les conditions physiologiques [86].

- Liaison non-covalente avec la cargaison

Les liaisons non-covalentes stables résident principalement dans des interactions électrostatiques et/ou hydrophobes entre le peptide vecteur et la cargaison. Les liaisons non-covalentes peuvent aussi être de type liaison hydrogène ou biotine-streptavidine, deux molécules très affines.



**Figure 24.** Différents types de liaisons covalentes entre le peptide vecteur et la cargaison. **(A)** Liaison peptidique, pont disulfure et liaison thioéther, **(B)** Synthèse chimique en tandem, **(C)** Recombinaison génétique

La première liaison non-covalente a été décrite en 1997 pour la complexation d'acides nucléiques avec le peptide MPG et développée par le groupe de Divita [69]. Ce complexe est capable d'être internalisé dans des cellules de mammifères en moins d'une heure et de cibler efficacement les acides nucléiques. Ce type de liaison a ensuite été décrit par Rydström et ses collaborateurs pour le peptide CADY complexé avec des siRNA [87].

## II. 2. Quel mécanisme d'internalisation cellulaire ?

Le premier contact du peptide vecteur avec la cellule est l'interaction du peptide avec la membrane plasmique. Les CPPs peuvent interagir avec de nombreux récepteurs membranaires de la cellule incluant les lipides membranaires ou les protéoglycanes associés à la membrane [88-90].

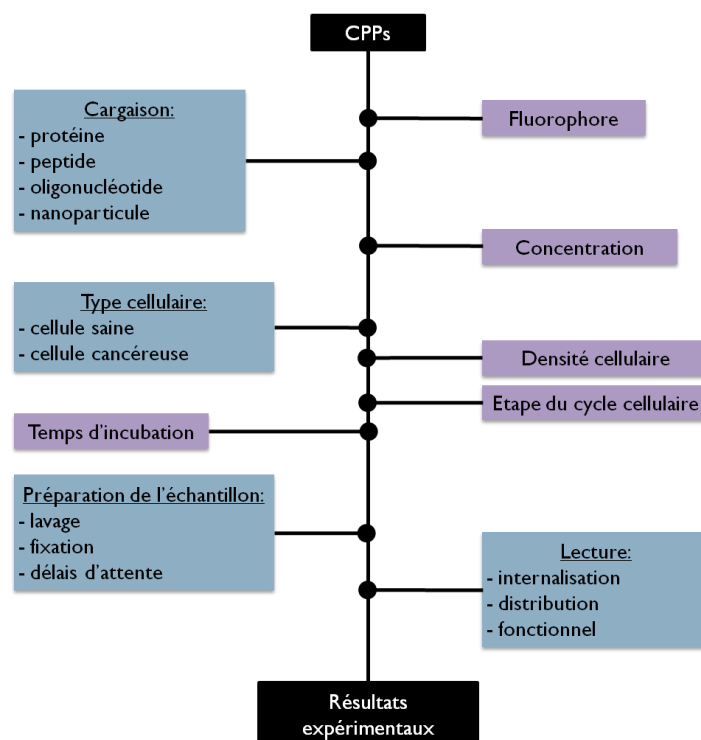
L'internalisation dans les cellules peut varier en fonction de différents paramètres comme la nature de la cargaison attachée au CPP, la nature des lipides ou même la concentration de CPP à proximité de la membrane. Une des raisons de la complexité de compréhension du mécanisme d'internalisation des CPPs réside dans le fait que de nombreuses études expérimentales se contredisent sur le processus d'internalisation.

Le mécanisme d'internalisation des CPPs est resté une question ouverte durant de nombreuses années suite à la découverte des CPPs. Cependant, en présence d'inhibiteurs de l'endocytose, en diminuant la température ou en supprimant l'apport d'ATP, l'internalisation reste efficace. De plus, elle est très rapide (de l'ordre de la minute) et non-saturante.

De ce fait, l'internalisation cellulaire des CPPs a, au départ, été décrite comme non endocytotique, énergie- et récepteur-indépendante. Les CPPs diffèrent donc des autres peptides utilisés pour la libération de médicaments (« Drug delivery ») car ils n'interagissent pas avec la membrane grâce à un récepteur spécifique ou par reconnaissance chirale.

Deux voies d'entrée principales des CPPs dans les cellules sont proposées : l'endocytose et la translocation directe à travers la membrane.

En effet, la littérature montre aujourd'hui que les CPPs ne sont pas internalisés par un seul type de transport [91; 92]. Des études ont montré que le mécanisme d'internalisation et la localisation intracellulaire du CPP dépend de la concentration du peptide à proximité de la membrane [93; 94]. La voie empruntée résulte aussi de la nature et de la taille de la cargaison ainsi que d'autres facteurs expérimentaux comme le type de lignée cellulaire, le temps et la température d'incubation entre autres. La Figure 25 présente les différents éléments pouvant affecter l'internalisation des CPPs.



**Figure 25.** Les différents facteurs expérimentaux pouvant influencer l'internalisation des CPPs. D'après [95].

### II.2.1. Interactions des CPPs avec les membranes cellulaires

Lorsqu'un peptide vecteur se situe à proximité d'une cellule, leur première rencontre se déroule à travers l'interaction peptide-membrane. Le peptide peut alors interagir avec les lipides, protéines et sucres de la membrane.

Comme cela a été décrit au paragraphe I, les CPPs possèdent une charge nette généralement positive donc l'interaction avec les membranes chargées négativement est principalement de nature électrostatique. La membrane eucaryote présente une proportion de phospholipides anioniques très faible comparée au nombre important de Glycosaminoglycanes (GAGs) à sa surface. Mais de nombreuses études sur des CPPs dérivés de Tat et de la pénétratine ont en effet montré que les CPPs avaient une affinité plus importante pour des vésicules chargées négativement [96; 97].



Les protéoglycanes de sulfate d'héparane (HSPGs) sont une famille dérivée des glycosaminoglycanes qui se différencient par leurs différentes ramifications. Les HSPGs se trouvent dans l'ensemble des tissus animaux et se lient à de nombreuses protéines de liaison comme des facteurs de croissance, des molécules de la matrice extracellulaire ou des molécules impliquées dans l'adhésion cellulaire. La liaison à ces protéines entraîne de nombreuses fonctions de régulation au sein de la cellule comme la différenciation cellulaire, l'angiogenèse, des mécanismes de défense ou même l'endocytose. Les HSPGs peuvent être conjugués à différentes protéines formant deux sous-familles majeures des HSPGs : les syndecanes (SDCs) et les glypicanes (GPCs).

La présence des groupes carboxyl et sulfate des HSPGs contribue amplement au caractère polyanionique des membranes cellulaires, ils agiraient comme un « piège électrostatique » pour les molécules cationiques proches de la membrane. Ceci rejoindrait la découverte faite un demi-siècle auparavant montrant que les peptides polybasiques augmentent l'internalisation de protéines dans des cellules de cultures [55]. Il a ainsi été prouvé par des études *in vivo* que la réticulation de protéines avec des glycosaminoglycanes (GAGs) augmente l'internalisation des peptides vecteurs [98]. En revanche, il semble que la délétion de GAGs à la surface des membranes ralentit ou empêche l'internalisation de certains CPPs [99; 100].

Des études sur les CPPs riches en Arg ont notamment montré que l'internalisation est dépendante du type d'interaction des CPPs avec les lipides membranaires et que cela n'est pas forcément dû aux charges positives présentées par les CPPs. En effet, la Lys crée une interaction monodentate avec le groupe phosphate des lipides tandis que l'Arg forme des interactions bidentate avec les multiples têtes polaires des lipides (Figure 27B). Ce dernier type d'interaction entraînerait une courbure Gaussienne négative de la membrane [101; 102] (Figure 27C).

Plus récemment, il a été révélé que des Trp « dispersés » entre les Arg des peptides pourraient déclencher l'internalisation par endocytose à travers la formation de feuillet  $\beta$  créant un cluster d'HSPGs. Cette internalisation est inhibée par la présence d'acide sialique, un autre polyanion présent à la surface des membranes. Ce dernier agirait comme un inhibiteur compétitif de la liaison des CPPs aux HSPGs empêchant ainsi l'agglomération (« clustering ») des HSPGs et donc l'endocytose des CPPs [103].

Cependant, il a été publié récemment par Verdurmen et ses collaborateurs que l'endocytose de certains peptides vecteurs ne possédant pas de résidus basiques comme le TPI0 n'est pas déclenchée par la formation de clusters d'HSPGs à la surface de la membrane. Au contraire, la liaison du TPI0 entraîne la formation de clusters plus larges que ceux observés avec R9, empêchant l'internalisation du peptide vecteur [104]. Ils montrent ainsi que TPI0 est séquestré à la membrane tandis que l'internalisation de R9 est stéréochimiquement dépendante de sa liaison aux HSPGs. De la même manière, Rydström et ses collaborateurs démontrent que le peptide CADY ne nécessite pas de liaison avec des HSPGs à la membrane mais s'internalise par translocation directe [87]. De plus, Jiao et ses collaborateurs révèlent en 2009 que l'internalisation n'est pas proportionnelle à l'affinité du peptide pour la membrane à 4°C (température à laquelle seule la translocation directe est possible) [100]. En effet, dans cette étude, le peptide Tat possède une meilleure affinité pour les membranes cellulaires mais c'est le peptide le moins internalisé. De plus, la courte période durant laquelle se déroule l'internalisation prouve que d'autres mécanismes entrent en jeu comme la liaison des peptides à des composants spécifiques de la membrane comme les phospholipides ou des glycosphingolipides [105]. En effet, de nombreuses études sur des membranes modèles indiquent que les CPPs induisent des perturbations de la membrane et plus spécifiquement en présence de certains lipides [106; 107].

Il a été montré que TPI0 induit de larges pores capables de laisser pénétrer des molécules de taille importante (comme des anticorps) dans des vésicules géantes unilamellaires [108].

Cette spécificité d'interaction avec les membranes chargées négativement présente un potentiel important qui entraîne un intérêt croissant pour les CPPs ces dernières années.

Les mécanismes d'endocytose peuvent être divisés en deux catégories : la phagocytose ou la pinocytose. La phagocytose concerne l'internalisation de larges particules et se restreint aux cellules telles que les macrophages, monocytes et les neutrophiles qui sont spécialisés dans l'élimination de pathogènes et de cellules infectées ou apoptotiques.

La pinocytose rassemble un grand nombre de mécanismes endocytotiques différents conduisant à l'internalisation de fluides, de solutés ou de composants membranaires. Quatre types d'endocytoses peuvent être distingués : l'endocytose dépendante des cavéoles/radeaux lipidiques, l'endocytose dépendante des clathrines, la macropinocytose et l'endocytose indépendante des cavéolines et des clathrines (Figure 26).

### II.2.2. L'endocytose dépendante des cavéoles/radeaux lipidiques

Les cavéoles (ou « caveolae » qui signifie « petites cavités ») sont des petites invaginations de la membrane en forme d'oméga et de taille de l'ordre de 50-100 nm. Elles sont composées, d'une part, de microdomaines lipidiques (« rafts ») riches en cholestérol et en sphingolipides, et d'autre part, de protéines orientées vers le cytoplasme, les cavéolines et forment des vésicules appelées cavéosomes (Figure 26). Les cavéoles ont été impliquées dans le transport du cholestérol cellulaire, dans l'endocytose de nombreuses protéines et dans l'entrée de pathogènes. Il a ainsi été montré que la voie des cavéoles pouvait être empruntée par Tat dans le mécanisme de transfert de gènes [77]. Enfin, l'inhibition de l'internalisation cellulaire de la pénétratine et du peptide Tat suite à la suppression du cholestérol et à l'inhibition de la toxine du choléra, montre qu'ils sont co-localisés avec les radeaux lipidiques [109].

### II.2.3. L'endocytose dépendante des clathrines

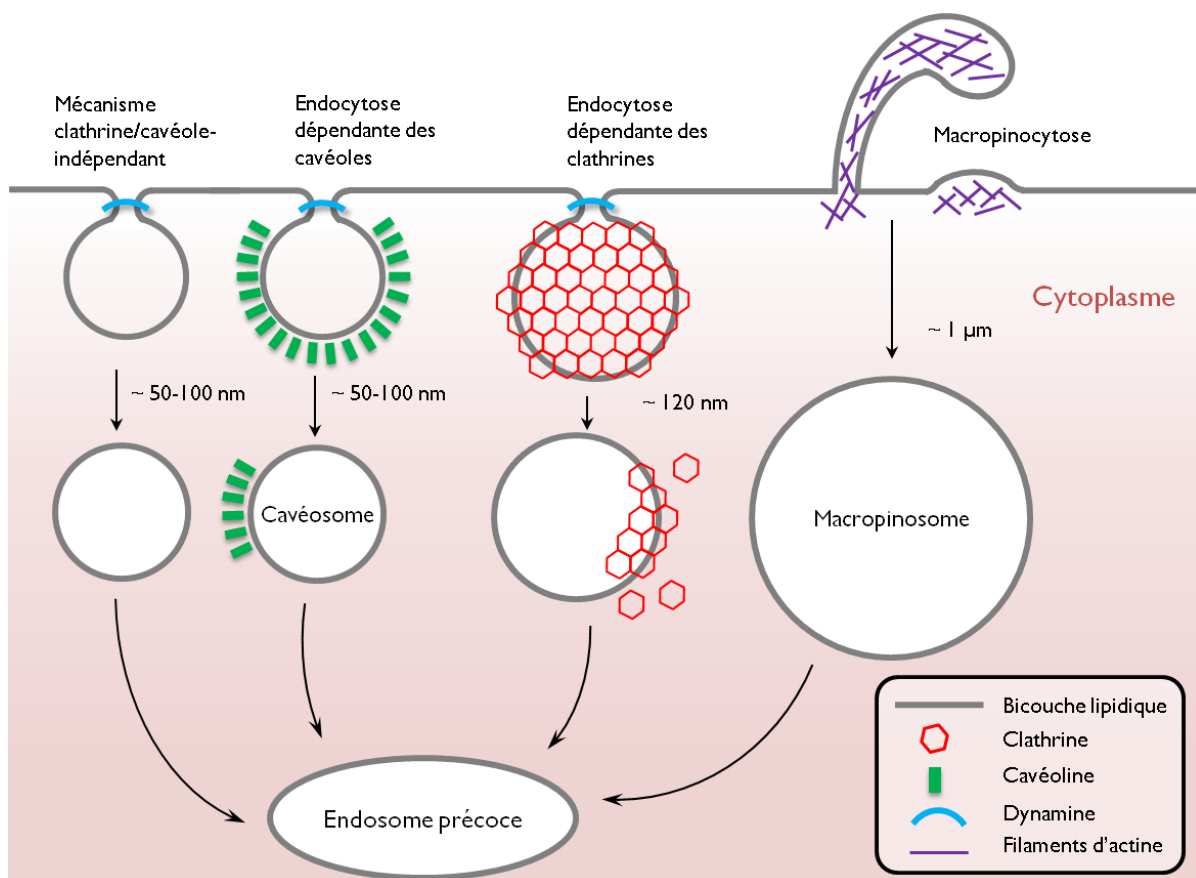
L'endocytose dépendante des clathrines forme une invagination de la membrane couverte d'un « manteau » de clathrine et de taille d'environ 120 nm (Figure 26). Lors d'études de l'internalisation du transportan par endocytose, il a été mis en évidence que le transport de ce peptide par endocytose clathrine-dépendante était diminué par l'ajout d'inhibiteurs de cette voie d'endocytose [66]. De plus, des études sur l'internalisation du peptide Tat montrent qu'il est co-localisé avec un marqueur de l'endocytose clathrine-dépendante, la transferrine [110].

### II.2.4. La macropinocytose

La macropinocytose est considérée comme un des systèmes endocytotiques les plus archaïques [111]. Celle-ci est conduite par la polymérisation de l'actine initiée par l'activation de GTPases de la famille des Rho-guanosinetriphosphatases (Rho-GTPases) travaillant de concert avec le lipide  $PI_{(4,5)}P_2$ .

La polymérisation d'actine à la surface de la membrane conduit à la formation de froissements de la membrane créant une extension membranaire plane et rugueuse de celle-ci, d'un diamètre pouvant aller jusqu'à 1  $\mu\text{m}$  (Figure 26).

Celle-ci vient encapsuler les molécules et les fluides extracellulaires à proximité de la membrane. La macropinocytose demeure la seule voie endocytotique non régulée par un mécanisme de récepteur/ligand et a été présentée comme une des voies principales de l'internalisation de certains peptides vecteurs, comme l'oligoarginine R8 [112].



**Figure 26.** Les différentes voies de l'endocytose

Dans le cas du peptide Tat, des études sur son internalisation ont révélé que celle-ci était inhibée par la cytochalasine D, un inhibiteur de la polymérisation de l'actine, démontrant l'implication de la macropinocytose [113].

Ces données indiquent que différentes voies d'endocytose peuvent être empruntées par les peptides vecteurs. Différents facteurs expérimentaux comme les différentes lignées cellulaires utilisées, les différentes cargaisons étudiées, la concentration de peptide incubé, entre autres, affectent les voies d'internalisations des CPPs et compliquent d'avantage la compréhension de leur mécanisme d'internalisation.

Malgré les études révélant que plusieurs voies de l'endocytose sont impliquées dans l'internalisation des CPPs, ces données indiquent également que la translocation directe des peptides à travers la membrane constitue un mécanisme d'internalisation important à ne pas négliger [114].

### II.2.5. La translocation directe

En dépit de leur nature polaire et fortement chargée, il a été proposé, notamment grâce à des études sur la pénétratine, que l'internalisation des CPPs se déroule par translocation directe sans perturber l'intégrité membranaire comme la formation de micelles inverses, de pores transitoires ou le co-transfert de peptide par des lipides.

La translocation directe a tout d'abord été considérée comme un artefact en raison d'expériences précédentes qui avaient été réalisées sur des cellules fixées, celles-ci étant perméables à la plupart des macromolécules. La fixation des cellules a ainsi mené à des résultats faussés révélant que les peptides étaient internalisés post-mortem. Néanmoins, grâce au développement d'études sur des cellules vivantes, il a été prouvé maintes fois que la translocation directe intervient, même si l'endocytose est considérée comme une des voies principales d'internalisation des CPPs. Des recherches sur la pénétratine, le peptide Tat ou les oligoarginines ont ainsi prouvé que ces peptides peuvent être internalisés par translocation directe dans les cellules [114-116]. Le mécanisme de translocation directe permettrait alors de délivrer directement les cargaisons au niveau du cytoplasme et au noyau sans perturbation létale pour la membrane.

De nombreuses études sur des modèles membranaires, permettant de mimer les membranes cellulaires et ne possédant pas toute la machinerie endocytotique cellulaire, ont été réalisées afin de mieux comprendre le mécanisme de translocation directe à travers les membranes et notamment l'interaction peptide/membrane.

Des études de spectroscopie de fluorescence sur des liposomes ont révélé que le peptide Tat n'induit pas de perturbation de la membrane [117] et n'entraîne pas de fuite de fluorophore [106; 118]. Cependant, des études de simulation de dynamique moléculaire et de mesure du potentiel membranaire avec le peptide Tat et la pénétratine ont montré que ces peptides induisent des pores transitoires dans les membranes [119; 120].

L'hypothèse d'une translocation directe des CPPs riches en Arg via un mécanisme de co-transport de lipides a aussi été proposée. L'interaction des CPPs serait favorisée par un couplage ionique (« ion pairing ») des charges positives du peptide avec un nanodomaine membranaire composé de lipides chargés négativement et permettrait la translocation du CPP [102; 121]. Des études avec le butyrate de pyrène, un contre-ion hydrophobe, aurait notamment montré que l'efficacité de translocation des CPPs est favorisée grâce au masquage des parties hydrophiles des Arg. En effet, pour le peptide R9, l'internalisation est la plus forte par rapport à d'autres CPPs comme la pénétratine ou pVec possédant moins d'Arg [122].

### II. 3. Effet de la cargaison sur l'internalisation des CPPs

Lorsqu'une molécule est couplée au CPP, l'efficacité, la voie d'internalisation et la toxicité du CPP peuvent être affectées [123; 124]. Par exemple, le peptide PKI qui inhibe la protéine kinase I voit son efficacité d'internalisation cellulaire diminuée lorsqu'il est couplé à l'oligoarginine R11 alors que l'inverse est observé quand celui-ci est couplé au transportan [109]. Des études d'internalisation avec le peptide Tat ont également démontré que la taille de la cargaison influence l'efficacité et le mode d'internalisation du CPP. Dans cette étude, plus la taille de la cargaison transportée est petite, plus le complexe sera efficacement internalisé dans les cellules [125].

### II. 4. Méthodes d'études de l'internalisation

L'internalisation cellulaire des CPPs peut varier en fonction des conditions expérimentales ainsi que de la technique employée pour l'étudier. L'ensemble des méthodes d'étude de l'internalisation des CPPs est présenté dans le Tableau 4.

Le couplage d'un fluorophore et l'observation de l'internalisation du CPP par microscopie de fluorescence apparaît comme une des techniques les plus couramment utilisées. Pour cela, il suffit de coupler un fluorophore au peptide, très souvent la fluorescéine, et d'observer son internalisation par différentes techniques de fluorescence. Ces techniques de couplage d'un fluorophore avec le CPP doivent être analysées avec précaution puisqu'elles peuvent altérer le mode d'internalisation, la localisation intracellulaire du peptide internalisé ainsi que la toxicité des peptides vecteurs comme cela a été décrit au paragraphe précédent.

Il n'existe donc pas une seule méthode efficace pour déterminer de manière non ambiguë l'efficacité d'internalisation d'un CPP, mais au contraire la combinaison de plusieurs méthodes est souvent recommandée pour permettre de contourner les aspects négatifs des différentes approches. Je décrirai succinctement ici les différentes techniques actuellement utilisées pour étudier l'internalisation cellulaire des CPPs.

Depuis l'apparition de la microscopie confocale, cette méthode d'étude est très largement utilisée puisqu'elle permet d'observer la fluorescence des cellules dans un seul plan focal. C'est une méthode souvent exploitée de manière qualitative. Néanmoins, elle ne permet pas de discriminer si les peptides sont intacts ou dégradés dans la cellule [126].

Une des méthodes les plus utilisées est la « Fluorescence-activated cell sorting » (FACS) qui est dérivée de la cytométrie en flux. Cette technique permet de différencier différents types de cellules, mortes ou vivantes, et fluorescentes ou non. Elle permet aussi de quantifier le nombre de cellules qui ont internalisé le fluorophore et de discriminer l'état du peptide dégradé ou non, grâce à l'utilisation d'enzymes telles que la trypsine ou la pronase. Elle ne permet néanmoins pas de faire la différence entre les peptides liés à la membrane, ceux internalisés dans les endosomes et ceux internalisés dans la cellule [127].

Méthodes	Résultats	Avantages	Inconvénients	Réf.
<b>Microscopie confocale</b>	Distribution intracellulaire du peptide marqué avec un fluorophore	Non biaisé par les peptides liés à la membrane	Pas de discrimination entre peptide intact et dégradé	[126]
<b>HPLC</b>	Localisation intracellulaire & dégradation des peptides	Détermination du peptide internalisé et dégradé	Restreint aux peptides contenant des amines primaires (Lys)	[75]
<b>FACS</b>	Internalisation cellulaire des peptides	Possible d'accéder au pourcentage de cellules transfectées et de discriminer entre cellules vivantes et mortes.	Pas de discrimination entre peptide internalisé et peptide lié à la membrane et peptide piégé dans des endosomes	[127]
<b>Spectrofluorométrie</b>	Quantité de peptide internalisé	Rapide, bon marché, et méthode facile pour une recherche initiale de nouveaux CPPs	Pas de discrimination entre peptide internalisé et peptide lié à la membrane ou peptide piégé dans les endosomes	[126]
<b>MET</b>	Distribution intracellulaire des peptides	Grossissement important permettant une visualisation au niveau des organelles	Préparation d'échantillons laborieuse nécessitant du personnel qualifié	[128]
<b>SM</b>	Détermination quantitative de l'internalisation, de la dégradation des peptides et des peptides liés à la membrane	Permet de suivre la dégradation du peptide et l'identification des produits de dégradation	Pas de discrimination entre peptide internalisé, peptide lié à la membrane ou peptide piégé dans les endosomes	[129]
<b>Correction d'épissage</b>	Activité biologique du conjugué CPP-SCO	Analyse positive évitant les interférences avec une toxicité non-spécifique Mesure l'activité biologique du cargo et pas seulement sa localisation	Cher et nécessite un accès à une lignée cellulaire spécifique (HeLa pLuc 705)	[130]
<b>Cre-recombinase</b>	Distribution cellulaire de protéines fonctionnelles	Lecture positive évitant les interférences d'une toxicité non-spécifique.	Nécessite l'expression de CPP-Cre protéine	[113]
<b>Apoptose &amp; prolifération</b>	Induction de l'apoptose et d'un arrêt de prolifération	Activité biologique du cargo et sa localisation	Peut être biaisé par une toxicité non-spécifique venant du peptide <i>per se</i>	[131]

**Tableau 4.** Résumé des différentes méthodes d'études de l'internalisation des CPPs. Adapté de [132].



La microscopie électronique peut être employée pour visualiser l'internalisation des CPPs mais cela nécessite une préparation spéciale des peptides (coloration au tétraoxyde d'osmium permettant d'augmenter le contraste), qui peut entraîner une modification de leur taux d'internalisation ou du mécanisme d'internalisation.

La méthode d'étude d'internalisation des CPPs utilisant la spectrométrie de masse (SM) a été développée récemment par Burlina et collaborateurs. Habituellement n'étant pas une méthode quantitative, dans ce protocole la SM permet la quantification du CPP internalisé dans des cellules en utilisant un standard interne [129]. Le standard est exactement le même CPP étudié mais avec un espaceur bi-deutééré ainsi qu'une biotine en N-terminal qui permet sa purification après incubation. Cette technique permet de quantifier le peptide internalisé et lié à la membrane, et de discriminer le peptide intact et dégradé. Ce protocole sera plus amplement détaillé dans le Chapitre IV car c'est la technique que nous avons choisi d'utiliser pour quantifier l'internalisation de nos CPPs.

Bien que les données fournies par les mesures de fluorescence soient utiles pour la mesure d'internalisation des CPPs, des mesures d'activité biologique semblent plus pertinentes, considérant le fait que les CPPs ont pour rôle de traverser les membranes et de délivrer une molécule bioactive. Des études ont cependant montré que certains CPPs sont capables de traverser les membranes mais que la cargaison perd son activité biologique [133]. Les données fournies par ce type d'expérience doivent donc être analysées avec précaution et si possible complétées avec d'autres analyses qualitatives.

La méthode de correction d'épissage se trouve être une méthode couramment utilisée et basée sur l'expression de la luciférase [130]. Le gène rapporteur de la luciférase est transfecté dans des cellules HeLa pLuc 705 et celui-ci est interrompu par l'intron de la  $\beta$ -globine pre-mRNA contenant un site d'épissage aberrant. En conditions normales, la luciférase non fonctionnelle est produite.

Lorsque des oligonucléotides de correction d'épissage (SCOs) couplés aux CPPs sont incubés et que l'internalisation a bien lieu, ils vont corriger l'erreur d'épissage et la luciférase fonctionnelle sera produite dans le cas d'une internalisation efficace des CPPs.

## II. 5. Spécificité des CPPs pour les cellules cancéreuses

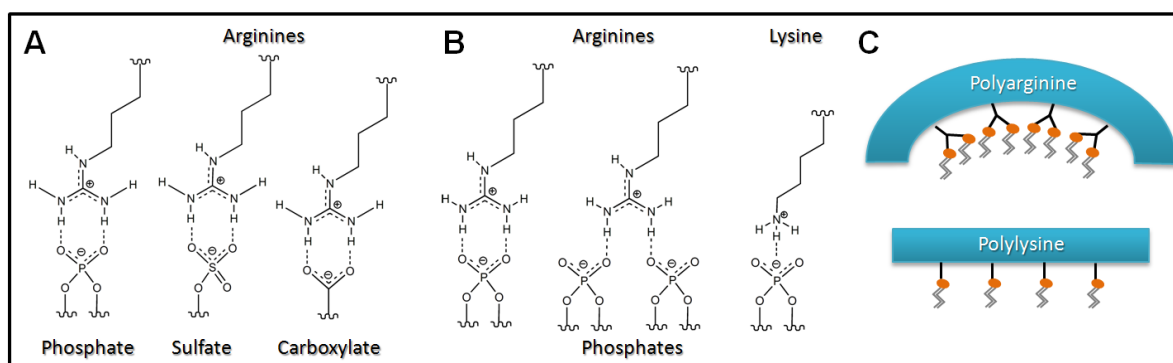
Un des problèmes récurrents dans le système de libération de molécules par les CPPs ainsi que d'autres méthodes de vectorisation, demeure la spécificité de ciblage des cellules ou de tissus spécifiques dans le but d'optimiser leur efficacité, leur rapidité d'internalisation et diminuer ainsi les effets secondaires. Des études ont récemment rapporté l'activité de molécules capables de se fixer sur des récepteurs exprimés à la surface des cellules. Ces petites molécules sont par exemple le peptide RGD (Arg-Gly-Asp), la bombesine ou la somatostatine. Leur activité diagnostique ou thérapeutique a été démontrée dans de nombreuses recherches [134-138]. Le motif RGD a la propriété de se fixer sur des récepteurs membranaires : les intégrines, plus fortement exprimés sur les cellules tumorales. Ces molécules n'agissent cependant qu'en présence de récepteurs. De plus, la biodistribution, la stabilité et l'efficacité d'internalisation de ces peptides nécessitent d'être considérablement améliorées.

Ainsi, les CPPs ont un potentiel intéressant en tant qu'agents non-invasifs pour la libération de molécules thérapeutiques ou diagnostiques dans les cellules. Ils ont un caractère cationique très prononcé et cela leur confère des propriétés d'interaction avec les charges négatives de la membrane avec une forte affinité [139]. Parmi les CPPs déjà utilisés à des fins thérapeutiques, le peptide Tat et la pénétratine ont prouvé leur efficacité lors de nombreuses études et sur différents types de cellules [76; 78]. Toutefois, dans ces études, l'interaction avec les membranes et l'internalisation de ces CPPs ne semble pas spécifique à un type de cellule.

Kondo et ses collaborateurs ont identifié en 2012 une série de CPPs capables de cibler les cellules tumorales. Ces peptides vecteurs sont composés d'une forte proportion d'acides aminés basiques. Le polyarginine (R9) est capable de s'internaliser dans tous les types de cellules (prouvant sa non-spécificité) tandis que la série de peptides et notamment certains peptides étaient capables de s'internaliser dans des lignées cancéreuses spécifiques [140; 141]. On les appelle les « tumor-homing peptides » (peptides ciblant spécifiquement les tumeurs).

La composition de la membrane possède un rôle bien particulier lors de l'internalisation cellulaire des CPPs. Les lipides avec une tête polaire PS, un lipide normalement présent en faible quantité du côté extracellulaire mais présent en quantité très élevée du côté intracellulaire de la membrane, sont redistribués sur la membrane plasmique de cellules tumorales et apoptotiques comme cela a été décrit dans le chapitre précédent [30; 142; 143]. Ce lipide agirait comme une « alerte cellulaire » en passant du côté interne au côté externe de la membrane des cellules et permettrait à la cellule d'être « repérée » par les phagocytes. Ce signal agirait comme un facteur efficace de reconnaissance une fois les phagocytes attirés près de la cellule. La PS, exprimée à la surface des cellules endothéliales prolifératives est ainsi un marqueur pour les vaisseaux sanguins angiogènes [144]. Le PS est donc un récepteur intéressant pour le diagnostic de cellules apoptotiques mais aussi pour le ciblage de ces cellules. De plus, il a été démontré que l'expression d'HSPGs à la surface des cellules cancéreuses était plus prononcée [26; 145-147].

Il semble donc que les charges négatives s'accumulent à la surface d'une cellule malade ou en phase d'être détruite par l'organisme. Des études ont prouvé que les CPPs présentent une affinité plus élevée pour les membranes chargées négativement [97; 148] et les Arg ont été mis en évidence comme résidus « magiques ». En effet, lorsque les résidus basiques des CPPs sont des Arg, les CPPs sont efficacement internalisés tandis que le remplacement des Arg par des Lys abolit totalement l'internalisation des CPPs [149; 150] (Figure 27A). De même, des cellules déficientes en GAGs à la surface de leur membranes internalisent moins bien les CPPs riches en Arg [97; 148].



**Figure 27.** (A) Différents types de récepteurs présents à la surface de la membrane ; (B) Interactions bidentates et monodentates avec les Arg et Lys ; (C) Schéma représentant la courbure membranaire en présence de polyarginine ou de polylysine. Figure adaptée de [151].

Ainsi, le caractère anionique plus marqué du feuillet externe des cellules tumorales vis-à-vis de cellules saines peut être un point à exploiter vis-à-vis d'une sélectivité de certains CPPs vers des cellules tumorales. Cet aspect concernant le ciblage des cellules tumorales (« tumor-homing ») des CPPs a donné lieu à la publication d'une mini-revue (Jobin ML. & Alves ID, *Biochimie*, 2014).

## II. 6. Activité antimicrobienne des CPPs

Les peptides antimicrobiens (AMPs) constituent un groupe de peptides, souvent dérivés de toxine de venins, avec la capacité de tuer un grand nombre de micro-organismes. Les organismes supérieurs (plantes, insectes, mammifères) produisent des AMPs sur les surfaces épithéliales ou dans les cellules endothéliales ou phagocytiques comme un mécanisme de défense contre les infections. Ils jouent un rôle important dans le système immunitaire de ces organismes.

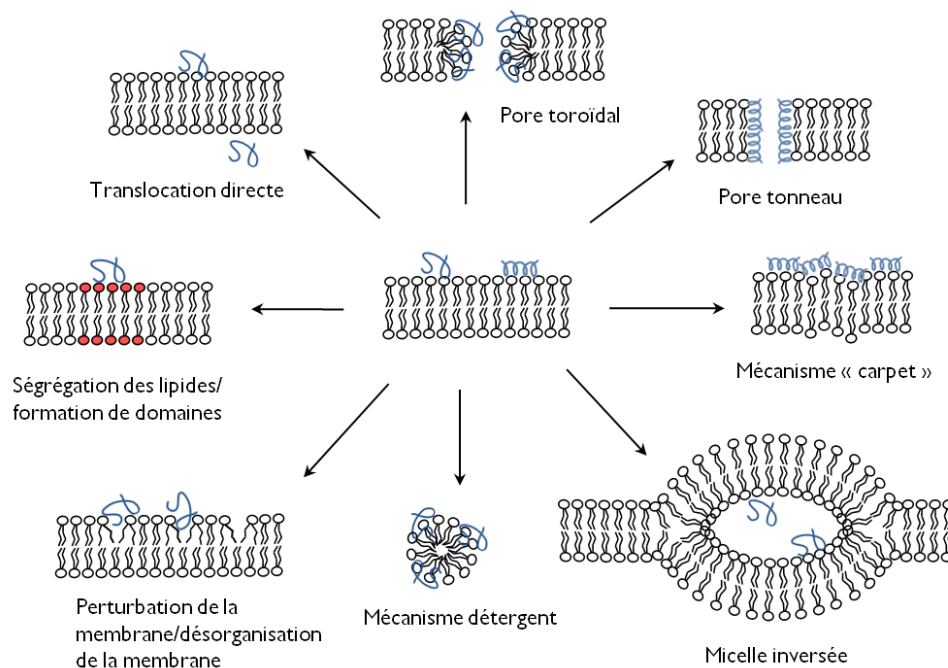
La plupart des AMPs sont des peptides amphipatiques (primaires ou secondaires, et en hélice  $\alpha$  ou en feuillet  $\beta$ ) avec une charge nette positive souvent résultant de la présence d'Arg et de Lys. Les AMPs sont généralement constitués de moins de 60 acides aminés et possèdent souvent environ 50% de résidus hydrophobes. Ils peuvent être classifiés en fonction de leur toxicité vis-à-vis des bactéries mais aussi en fonction de leur structure secondaire. Beaucoup d'AMPs sont lytiques vis-à-vis des membranes cellulaires, néanmoins, certains ont la capacité de s'internaliser dans les membranes eucaryotes. En effet, tous les AMPs partagent leur faculté à interagir avec la membrane plasmique des cellules sans nécessairement induire une perméabilisation permanente de la membrane. Les caractéristiques physico-chimiques des CPPs et des AMPs sont très semblables et il a été montré que certains CPPs possèdent une activité antimicrobienne et vice-versa, comme cela est décrit plus bas [152-154].

La bicouche lipidique des membranes bactériennes possède un caractère anionique fort dû à la présence de lipides anioniques (acide phosphatidylglycérol, acide phosphatidique, cardiolipide) et à la présence importante de lipopolysaccharides (bactéries Gram-) ou aux acides de polysaccharides ou teichoïques (bactéries Gram+). Le mode d'interaction des AMPs avec la membrane a été décrit de deux manières : pore-dépendant, mécanisme le plus commun, ou pore-indépendant (Figure 28).

Certains AMPs ont été utilisés dans le transport de molécules thérapeutiques, comme la pyrrhocoricine ou encore la lactoferrine [155-157].

Peptide composé de 20 résidus, la pyrrhocoricine est isolée à partir d'insectes et seulement efficace contre les bactéries Gram-. Ce peptide est capable de désactiver sa protéine cible sans perturber l'intégrité de la membrane. Otvos et ses collaborateurs ont ainsi montré que ce peptide antimicrobien pouvait transporter un peptide à travers les membranes de cellules de fibroblastes humains et des cellules dendritiques [157].

La lactoferrine est une protéine produite dans le lait humain (hLF) et c'est également une protéine importante dans le processus de défense immunitaire antifongique, antimicrobien et antiviral. Une version tronquée de ce peptide (résidus 38-59) a montré une internalisation efficace dans des cellules humaines HeLa ou de cellules de rat IEC-6, et dans le cytoplasme et le noyau. Le mécanisme d'internalisation de ce peptide est dépendant de sa concentration et semble similaire à certains peptides vecteurs riches en Arg.[155; 156]. En effet, la lactoferrine se lie aux charges négatives de la membrane neutralisant ainsi ses charges positives grâce à des interactions électrostatiques. Cela entraînerait une perturbation de la membrane sans pour autant entraîner de dommages importants (pas de formation de pores ou de destruction de la membrane), et ayant pour conséquence la translocation de la protéine.



**Figure 28.** Illustration des différents mécanismes de translocation directe des peptides membranotropes (CPPs et AMPs) conduisant à l'internalisation cellulaire et/ou à la déstabilisation membranaire.

La fonction de ces peptides, qu'elle soit de pénétration dans les cellules ou bactéricide, semble dépendre de la composition lipidique de la membrane plasmique ciblée [158; 159] ainsi que de la composition d'acides aminés du peptide [160]. Ainsi, le même peptide peut avoir des actions différentes quand il interagit avec les membranes en fonction de leur composition.

La ressemblance et les fonctions similaires des CPPs et des AMPs a conduit à l'utilisation du terme « peptide membranotrope » (« membrane-active peptide ») approprié comme terme générique pour tous les peptides qui exercent leur fonction en interagissant avec les membranes (Figure 28) [152; 161; 162].

### MESSAGE A RETENIR

- Les CPPs ont la capacité de traverser les membranes cellulaires de manière récepteur- et énergie-indépendante sans détruire les cellules ;
- Les CPPs peuvent transporter des cargaisons de type et de tailles variées dans différentes lignées cellulaires ;
- La voie d'internalisation des CPPs dépend de nombreux facteurs : technique d'étude, lignée cellulaire, température, cargaison, ... ;
- Les CPPs ont des propriétés similaires à celles des AMPs et *vice-versa* ;
- Les interactions électrostatiques sont importantes pour déclencher l'internalisation des CPPs ;
- Certains CPPs cationiques présentent une spécificité d'interaction pour les cellules cancéreuses.

### **III. Les CPPs étudiés au cours de ce doctorat : objectifs**

#### **III. 1. RW16**

RW16 ( $R_1RWRRWWRRWWRRWRR_{16}$ ) est un peptide de 16 acides aminés, synthétisé à partir d'études de structure-activité de la pénétratine, qui s'internalise efficacement dans des cellules de CHO [163]. Il perméabilise les cellules en moins de 10 minutes sans être létal pour la cellule et des tests de cytotoxicité ont montré qu'il n'est pas toxique jusqu'à 20 $\mu$ M de peptide incubé [164].

Lamazière et ses collaborateurs ont également montré que RW16 induit la formation de larges tubules sur des vésicules géantes ainsi que l'agrégation de vésicules composées de 10% de lipides anioniques [164]. De plus, Delaroche et ses collaborateurs ont montré que RW16 ralentit la polymérisation de l'actine en interagissant avec celle-ci et entraîne l'inhibition compétitive de sa polymérisation. Cette étude confirme que RW16 a la capacité de ralentir la croissance tumorale de fibroblastes embryonnaires. Il a aussi été exposé que ce peptide transporte efficacement dans le cytoplasme la phosphotyrosine 1068 du récepteur de croissance (EGF) à travers la membrane de cellules de myoblastes [165].

Ainsi, aucune étude approfondie sur le mode d'interaction de RW16 avec des membranes modèles de types tumorales ou non-tumorales n'ont été réalisées auparavant.

La première partie de mon projet s'articule donc autour de la compréhension du mode d'action de RW16 en présence de modèles membranaires zwitterioniques afin de mimer les cellules saines, et anioniques pour imiter les membranes cellulaires bactériennes et tumorales.

#### **III. 2. RW9 et RX9**

RW9 (RRWWRRWRR) est un CPP dérivé de l'hexadecapeptide RW16. Il a été montré que RW9 est un des CPPs les plus efficacement internalisés parmi les dérivés de la pénétratine [166]. Les études sur le peptide Tat ont indiqué qu'il possède un grand nombre de résidus basiques (6 Arg et 2 Lys sur 13 résidus) et à partir de cela le groupe de Futaki a synthétisé des oligoarginines de différentes longueurs en acides aminés ( $R_n$  avec  $6 < n < 12$ ) et a étudié leur efficacité d'internalisation [73].



Ces derniers ont pu ainsi déterminer que la séquence la mieux internalisée était celle composée de 8 ou 9 résidus. Par la suite différents dérivés de la pénétratine ont été synthétisés et il a été mis en évidence que leur internalisation n'était pas dépendante ni de sa chiralité et de son amphiphilicité, ni de sa structure secondaire [61; 63]. La présence des résidus basiques dans la séquence des CPPs a été largement étudiée et bien assimilée et plus spécialement les Arg qui ont été rapportés comme des résidus "magiques" nécessaires pour une internalisation efficace des CPPs dans les cellules. En effet, l'interaction électrostatique entre les Arg et les phosphates des lipides membranaires a été démontrée comme essentielle au cours de la première étape de l'interaction avec la membrane. Pour les peptides riches en guanidinium, il est généralement suggéré que les peptides interagissent avec les charges négatives des protéoglycanes d'héparane sulfate (HSPGs) de la surface membranaire en première reconnaissance. De plus, il a été démontré que l'efficacité d'internalisation était attribuée aux types de liaison que forment les Arg plutôt que la charge positive présentée à la membrane. En effet, les Arg forment une liaison hydrogène bidentate avec les parties phosphates sur de multiples têtes polaires tandis que les Lys ne forment qu'une liaison monodentate qui interagit avec les parties phosphate sur une seule tête polaire.

Bien que le rôle des résidus cationiques, et notamment celui des Arg, dans la séquence peptidique des CPPs commence à être relativement compris, celui des résidus hydrophobes paraît beaucoup moins établi. Les premières études de structure-activité sur la pénétratine avec le remplacement des Trp<sup>48</sup> et Trp<sup>56</sup> par des Phe ont d'abord montré que ces acides aminés étaient essentiels pour l'internalisation cellulaire de la pénétratine [61]. Au contraire, d'autres études sur l'oligoarginine R9 ont montré que son efficacité d'internalisation cellulaire est 20 fois supérieure à celle du peptide Tat et comparable au taux d'internalisation de la pénétratine [72]. Bechara et collaborateurs ont récemment publié une étude montrant que l'affinité des peptides pour les membranes est dépendante du nombre de Trp [103].

L'objectif de ce projet consiste donc à comprendre le rôle que jouent les Trp dans la séquence peptidique des CPPs et pourquoi dans certains cas l'absence de Trp est délétère pour l'internalisation des CPPs mais non dans d'autres cas. La seconde partie de mon projet porte donc sur l'étude du rôle des Trp dans la séquence de RW9 lors de son internalisation cellulaire et de son interaction avec des membranes modèles.

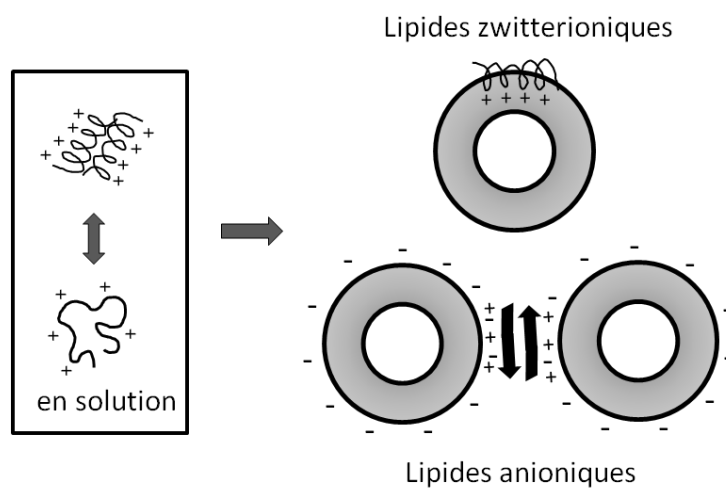


# RESULTATS & DISCUSSION



# CHAPITRE III

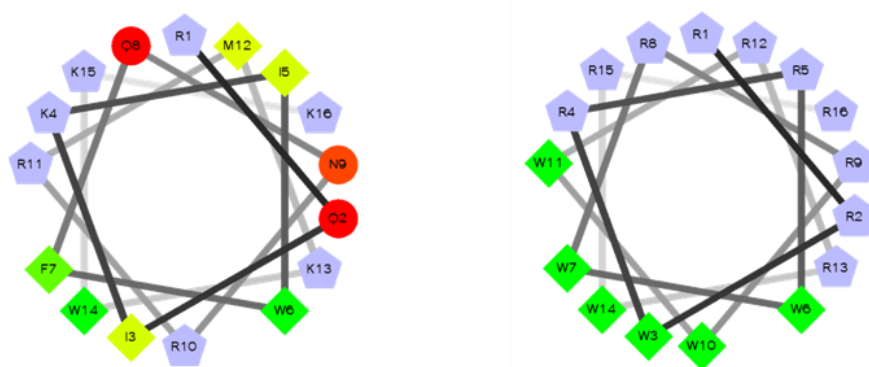
## ETUDE DE L'INTERACTION DE RWI 6 AVEC DES MEMBRANES MODELES





## I. Le peptide vecteur RWI6

RWI6 est un peptide dérivé de la pénétratine, composé de 16 résidus dont 10 Arg et 6 Trp (Tableau 5). C'est un peptide amphipathique secondaire se structurant en hélice  $\alpha$  (Figure 29). Ce peptide est un CPP efficace et a montré une activité anticancéreuse sur des cellules de fibroblastes (cellules EF et NIH/3T3) [167]. Il n'est pas cytotoxique jusqu'à 20  $\mu$ M sur des cellules eucaryotes. Cependant, son mécanisme d'interaction en présence de membranes modèles ainsi que la compréhension de ce comportement en relation avec son activité anticancéreuse et antimicrobienne n'ont pas été étudié.



**Figure 29.** Roue hélicoïdale de la pénétratine **(A)** et de RWI6 **(B)**. Les acides aminés hydrophobes sont représentés en losange et les résidus chargés positivement en pentagone. Le degré d'hydrophobicité est représenté en vert avec l'hydrophobicité diminuant vers le jaune, et les résidus hydrophiles sont en rouge et l'hydrophilicité diminuant vers le bleu. Les projections ont été générées sur <http://r3lab.ucr.edu/scripts/wheel/wheel.cgi>

<b>Pénétratine</b>	R Q I K I W F Q N R R M K W K K
<b>RWI6</b>	R R W R R W W R R W W R R W R R

**Tableau 5.** Comparaison des séquences d'acides aminés de la pénétratine et de RWI6.

L'objectif de ce travail est donc de comprendre les bases de son mécanisme d'action plus spécifiquement concernant son activité anticancéreuse. Etant donné que ce peptide doit rencontrer la membrane lipidique et la traverser afin d'exercer son activité à l'intérieur de la cellule, son mode d'interaction avec les membranes cellulaires saines et cancéreuses doit être exploité. Pour cela, des études biophysiques ont été réalisées afin de caractériser l'interaction de ce peptide avec des membranes lipidiques modèles. Ainsi, l'effet de RWI6 sur des liposomes, sa structure secondaire en présence de lipides, sa partition et affinité pour la membrane ainsi que son insertion dans des liposomes ont été étudiés.

La membrane plasmique d'une cellule eucaryote est principalement constituée de lipides zwitterioniques sur son feuillet externe.

Cependant, la composition lipidique du feuillet externe peut varier en fonction de l'état de la cellule (angiogénique, apoptotique, ...) et ainsi augmenter sa proportion de lipides anioniques (PS) sur sa surface membranaire [30; 32]. Les études ont été réalisées sur des lipides zwitterioniques (DOPC ou DOPE) et anioniques (DOPS ou DOPG) afin de mimer la membrane cellulaire saine et cancéreuse, respectivement.

## I. I. Activité antimicrobienne de RWI6

Certains AMPs ont montré une activité d'internalisation et inversement certains CPPs ont révélé une activité antimicrobienne [153; 154]. Pour cette raison, l'activité antimicrobienne de RWI6 a été mesurée sur des bactéries de type Gram+ (*S. Aureus*) et Gram- (*E. Coli* et *K. Pneumoniae*) (Tableau 6). Ces expériences ont montré que RWI6 inhibe la croissance des bactéries avec une concentration minimale inhibitrice (MIC) de l'ordre du micromolaire. RWI6 possède un effet bactéricide sur *E. Coli*, c'est à dire que la bactérie meurt après action de RWI6 tandis qu'il a un effet bactériostatique sur *S. Aureus*, c'est-à-dire que la bactérie est capable de continuer à se diviser après action de RWI6.

Peptide	<i>E. Coli</i>	<i>S. Aureus</i>	<i>K. Pneumoniae</i>
<b>RWI6</b>	10 $\mu$ M*	5 $\mu$ M	> 100 $\mu$ M

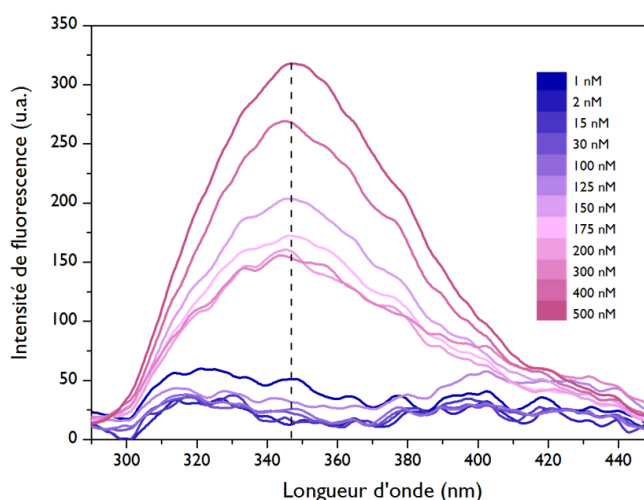
**Tableau 6.** Activité antimicrobienne et lytique de RWI6. L'activité antimicrobienne est exprimée en MIC (Concentration Minimale Inhibitrice). \*Un effet lytique a été observé à cette concentration



## I. 2. Oligomérisation du peptide en solution

La composition en acides aminés et surtout le caractère amphipathique de RWI6 induit à penser qu'il pourrait s'agréger en solution et former des oligomères. En effet, cela a déjà été observé pour des CPPs ou des AMPs amphipatiques lors de la formation de pores [168]. Pour cela nous avons utilisé la diffusion dynamique de la lumière (DLS) afin de mesurer le rayon hydrodynamique ( $R_h$ ) d'une éventuelle formation de larges particules en solution.

Aucun signal n'a été détecté jusqu'à une concentration de 5 nM (indiquant qu'il n'y pas de particules de taille importante ou que les objets sont trop petits ou en faible quantité). Cependant, au-delà de cette concentration, nous avons observé l'apparition de particules d'un rayon hydrodynamique compris entre 90 et 170 nm indiquant une agrégation du peptide à partir de très faibles concentrations en solution. Le rayon hydrodynamique des particules observé en solution étant polydisperse ( $0,1 < \text{pdi} < 0,4$ ) nous n'avons pas pu estimer le nombre de peptides composant ces agrégats.



**Figure 30.** Spectres de fluorescence de RWI6 en solution (tampon Tris 10mM pH 7.4) à des concentrations variant entre 1 nM et 500 nM.

L'oligomérisation du peptide en solution a aussi été observée en suivant l'émission de fluorescence du Trp du peptide (Figure 30). Dans un premier temps, nous n'avons pas pu observer de fluorescence à très basse concentration, principalement à cause de la sensibilité de l'appareil. La fluorescence n'est observable qu'à partir d'une concentration de 150 nM. A partir de cette concentration, nous observons que le maximum de fluorescence se situe à une longueur d'onde de 347 nm.

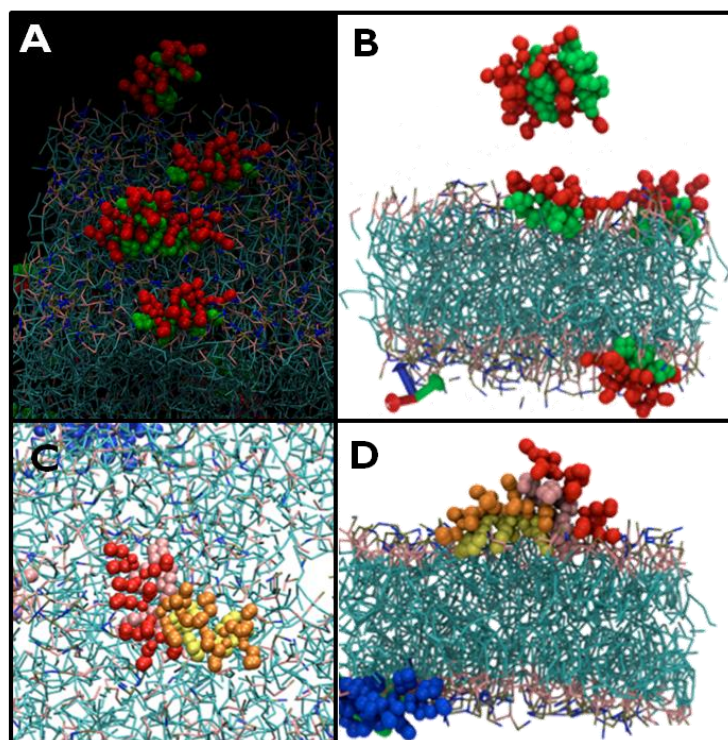
Il y a donc un "blue shift", décalage du maximum de longueur d'onde vers des longueurs d'onde plus basses. En effet, le maximum de longueur d'onde du Trp est de 350 nm et un maximum de longueur d'onde à 347 nm montre que les Trp sont dans un environnement légèrement plus hydrophobe que le milieu aqueux. De plus, on observe qu'en augmentant la concentration de 150 nM à 300 nM, l'intensité du maximum de fluorescence diminue ce qui signifie que le rendement quantique de fluorescence des Trp diminue et montre ainsi qu'il y a une inhibition de fluorescence. Ceci démontre que le peptide s'oligomérisé en créant des interactions autre que des interactions hydrophobes. Au delà de 300 nM, la fluorescence augmente de nouveau avec la concentration. Cela résulte de la concentration croissante des particules fluorescentes en solution.

- Simulation de Dynamique Moléculaire (MD)

Au cours de cette thèse une collaboration a été réalisée avec l'équipe de Patrick Fuchs, au DSIMB (Univ. Paris Diderot). Ils ont réalisé des simulations de dynamique moléculaire (MD) de RWI6 en solution et en présence de membrane composée de DOPC à un ratio P/L 1/25 et dans les mêmes conditions expérimentales que les nôtres (Figure 31).

Ils ont ainsi pu observer que le peptide forme des dimères à proximité ou à la surface de la membrane. L'interaction peptide/peptide se déroule via la partie C-Terminale des peptides et engage des Arg et des Trp mais ils n'ont pas pu observer d'interactions hydrophobes entre les Trp. Cela rejoint les données de fluorescence montrant que l'environnement des Trp devient légèrement plus apolaire mais qu'il y a un quenching résultant d'interactions entre les Trp et les Arg.

Ceci provient certainement du fait qu'il y a des interactions  $\pi$ -cations possibles entre certains Trp et Arg. Cela a déjà été observé par des études structurales par RMN sur le peptide RW9 pour lequel des interactions  $\pi$ -cations ont été observées entre le Trp<sup>4</sup> et le Trp<sup>7</sup> et l'Arg<sup>8</sup> [97]. Ces études ont aussi permis de mieux comprendre les interactions P/L, décrites plus bas.



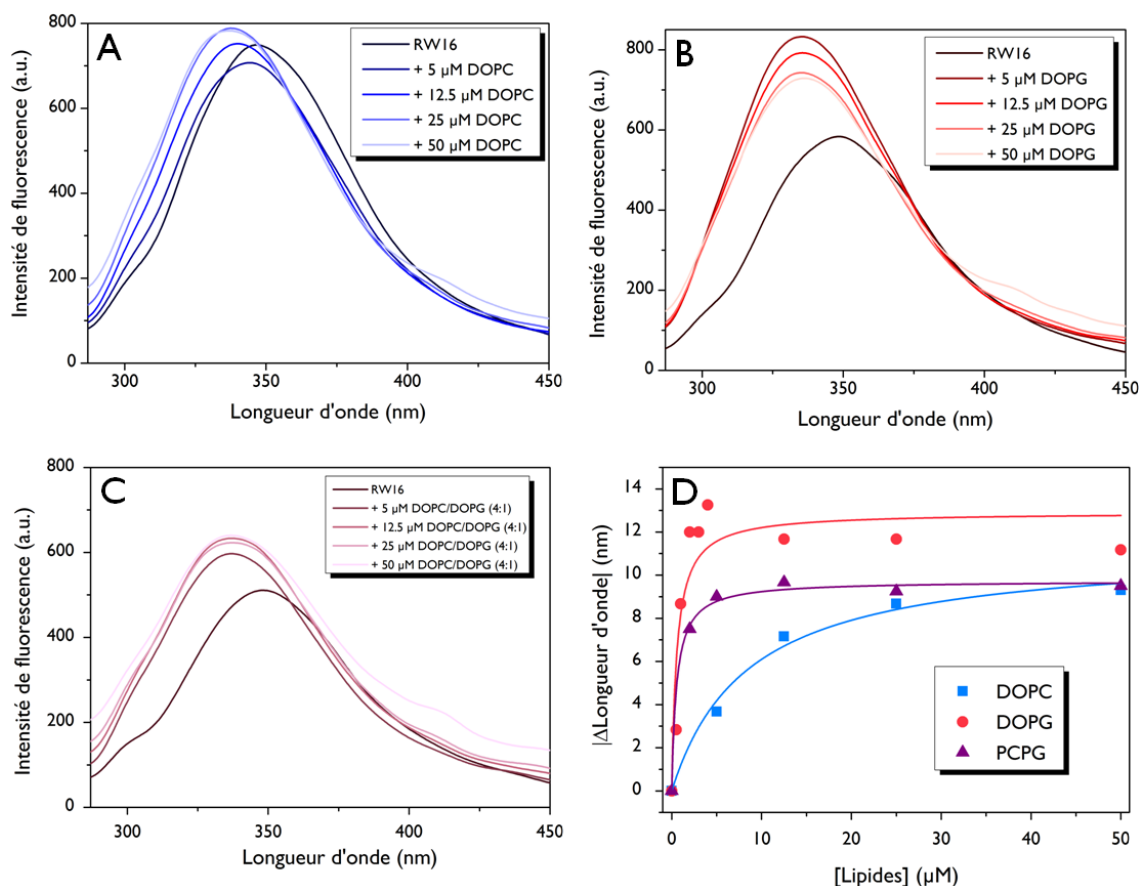
**Figure 31.** Simulation MD de RW16 en présence de membranes. La membrane est représentée en bleu et rose. A et C. Vue de dessus; B et D. Vue de côté; A et B. Les Arg sont en rouge et les Trp sont en vert. C et D. Les Arg sont en rouge et orange, les Trp sont en rose et jaune. Simulations gros-grain: 200 DOPCs, 5 peptides, 37°C, 500 ns; le peptide est pré-inséré à la surface de la membrane.

## **II. Effet des membranes sur RWI6**

### **II. I. Fluorescence de RWI6 en présence de vésicules lipidiques**

La fluorescence du Trp a été étudiée afin de suivre les changements d'environnement des Trp de RWI6 en suivant l'interaction P/L (Figure 32). Ces expériences ont été réalisées pour RWI6 seul et en présence de LUVs de DOPC (Figure 32A), DOPG (Figure 32B) et DOPC/DOPG (4:1) (Figure 32C). La concentration de peptide utilisé était de 0.5  $\mu\text{M}$ , concentration à laquelle il se trouve dans une conformation oligomère. Du fait des limitations de détection de cette technique il s'avère impossible d'effectuer des mesures à des concentrations inférieures.

En présence de liposomes, nous avons observé dans tous les cas un décalage du maximum de fluorescence ( $\lambda_{\text{max}}$ ) des Trp vers des longueurs d'onde plus basses (« blue-shift » ou décalage hypsochromique) ainsi qu'une augmentation de l'intensité de fluorescence. Un « blue-shift » reflète un changement d'environnement du Trp d'un environnement hydrophile (tampon) vers un environnement plus hydrophobe dû à l'absorption membranaire ou à son insertion [169]. Dans un environnement polaire le  $\lambda_{\text{max}}$  est généralement autour de 350 nm tandis que dans un environnement apolaire celui-ci se situe autour de 330 - 340 nm.



**Figure 32.** Spectres de fluorescence du Trp de RW16 (0.5  $\mu\text{M}$ ) en présence de vésicules de DOPC (**A**), DOPG (**B**) et DOPC/DOPG (4:1) (**C**). Variation du maximum de longueur d'onde pour les 3 types de liposomes (DOPC, DOPG et DOPC/DOPG) représentée en fonction de la concentration en lipides et pour une concentration fixe de peptide de 0,5  $\mu\text{M}$  (**D**).

Nous avons observé qu'en présence de LUVs de DOPG le décalage de longueur d'onde final est le même que pour les LUVs de DOPC (de 347 nm à 338 nm, décalage d'environ 9 nm) mais la concentration nécessaire pour atteindre 50 % du décalage de longueur d'onde est environ 10 fois plus petite dans le cas de LUVs de DOPC. Ceci est en accord avec un enfouissement des résidus Trp dans le cœur hydrophobe de la membrane.

Le changement d'environnement des Trp vers un environnement plus hydrophobe peut résulter soit d'une auto-association du peptide au cours de laquelle les résidus Trp seraient en contact avec les résidus Trp d'un autre peptide soit d'un enfouissement des résidus Trp dans la région des chaînes d'acides gras des lipides. A cette concentration (0.5  $\mu\text{M}$ ), on rappelle que le peptide doit se trouver dans une conformation oligomère.

Nous pensons qu'en présence de DOPG le peptide interagit avec la membrane à travers des interactions électrostatiques, l'accumulation du peptide à la surface de la membrane conduit à des interactions peptide/peptide fortes, à la déstabilisation de la membrane et potentiellement à la formation de pores. Pour relâcher cette répulsion électrostatique entre les oligomères de peptide, certaines molécules vont s'insérer plus profondément (« flip ») dans la membrane ce qui explique les « blue-shift » observés.

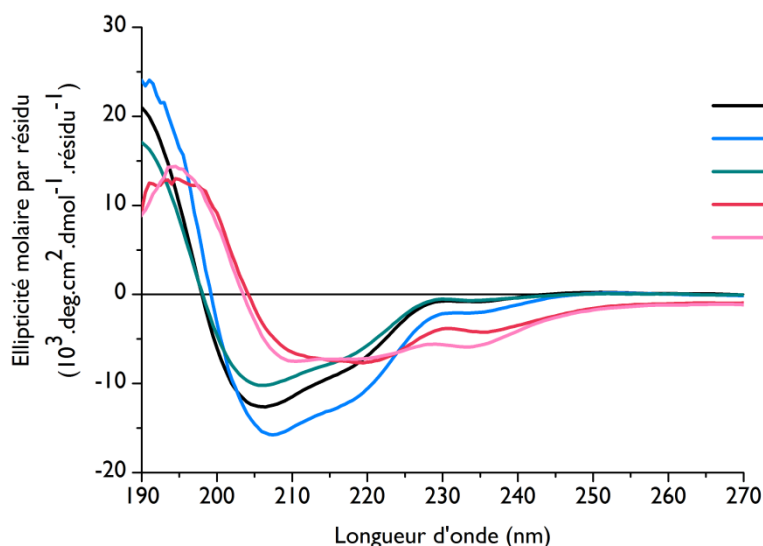
Dans le cas du DOPC, le même mécanisme intervient, c'est à dire l'insertion des Trp dans la région hydrophobe de la bicouche (même décalage de  $\lambda_{\max}$ , et augmentation de l'intensité de fluorescence) la seule différence étant que la concentration nécessaire pour déclencher ce mécanisme est plus élevée car il y a moins de répulsion électrostatique avec les lipides. Jusqu'à une certaine concentration, le peptide reste en solution sous forme d'oligomère, et à une concentration plus élevée, la répulsion de charge entre les oligomères de peptide augmente, le peptide interagit avec la membrane et s'insère dans le cœur hydrophobe. Ce « flip » du peptide grâce à un mécanisme charnière joué par les Arg a été reporté pour des peptides proches, RW9 et RL9, par des études de dynamique moléculaire [170].

Pour des vésicules de composition mixte (DOPC/DOPG), la concentration nécessaire pour atteindre le même "blue-shift" est similaire à celle observée pour des vésicules de DOPG. L'explication est donc la même dans ce cas que celle proposée pour les vésicules de DOPG. Cependant, il semble qu'il y ait une compétition entre les lipides zwitterioniques et les lipides anioniques. Ces résultats convergent avec les résultats de fuite de calcéine et de DSC (décrits plus bas) où la perturbation des liposomes composés de lipides anioniques est plus prononcée. Cela rejoint en plus les expériences d'ITC (décrites plus bas) qui montrent l'importance des interactions hydrophobes entre peptide et lipide par rapport aux interactions électrostatiques.

## II. 2. Structure secondaire de RW16

La structure secondaire de RW16 a été étudiée en solution et en présence de membranes pour étudier l'effet de l'interaction peptide-lipide sur sa structure secondaire et observer si cela affecte son interaction avec les membranes.

Des expériences de dichroïsme circulaire (CD) ont été réalisées avec le peptide en solution (10 mM de tampon phosphate, pH 7.4) ou en présence de vésicules de différentes compositions: DOPC, DOPE, DOPG et DOPS et à différents ratios peptide/lipide (P/L) : 1/50, 1/25, 1/10 avec une concentration de RW16 variant entre 25  $\mu\text{M}$  et 111  $\mu\text{M}$  (Figure 33). A ces concentrations, le peptide est donc dans une conformation oligomère.



**Figure 33.** Spectres de dichroïsme circulaire de RW16 en solution (tampon phosphate 10mM pH 7.4) et en présence de LUVs de composition différentes (DOPC, DOPE, DOPG ou DOPS). Le ratio P/L est de 1/25 et la concentration de peptide est de 25 $\mu\text{M}$ .

La décomposition spectrale a été réalisée grâce au logiciel CDFriend (Tableau 7). D'après le spectre CD, le peptide est principalement non structuré en solution avec un pourcentage de pelote statistique de 54 % et d'hélice  $\alpha$  de 46 %. En présence de lipides zwitterioniques (DOPC ou DOPE), la structure secondaire du peptide ne change pas de manière significative. Le pourcentage d'hélice  $\alpha$  est de 60% pour des vésicules de DOPC et de 40 % pour des vésicules de DOPE.

En présence de lipides anioniques, le spectre de CD change de profil et on peut clairement observer que le peptide semble adopter une structure de type feuillet  $\beta$ . En effet, d'après les décompositions spectrales, le pourcentage de feuillet  $\beta$  est de 40% tandis que le pourcentage d'hélice  $\alpha$  diminue jusqu'à 20% et la proportion de pelote statistique est de 40%.

<b>I/25 RWI6</b>	<b>Tampon</b>	<b>DOPC</b>	<b>DOPE</b>	<b>DOPG</b>	<b>DOPS</b>
<b>Hélice <math>\alpha</math> (%)</b>	46	59	38	17	19
<b>Feuillet <math>\beta</math> (%)</b>	0	0	0	43	40
<b>Random coil (%)</b>	54	40	62	40	41

**Tableau 7.** Pourcentages de structures secondaires de RWI6 (25  $\mu$ M) en absence et en présence de LUVs (P/L I/25) calculés d'après le logiciel CDFriend.

Comme cela a été montré par les résultats de fluorescence du Trp, où un blue-shift en présence de lipides anioniques est observé, ces résultats révèlent que l'interaction de RWI6 avec des lipides anioniques conduit à un changement de structure secondaire du peptide. De tels changements peuvent être attribués à une forte accumulation du peptide en conformation oligomère à la surface de la membrane chargée négativement et créant des agrégats de peptides avec une conformation de type tapis ("carpet") sur la membrane.

Ces changements conformationnels ont déjà été observés dans la littérature pour la pénétratine ou d'autres CPPs et ont été décrits comme un comportement "caméléon" par Magzoub et collaborateurs [171]. Dans ces études, ils expliquent que le changement de structure en feuillet  $\beta$  du peptide résulte de l'agrégation de peptides à la surface de la membrane en raison de la densité de charge importante des vésicules. Ainsi, plus la densité de charge est élevée, plus l'interaction électrostatique est élevée et facilite les interactions P/L.



De plus, nous avons observé la présence de bandes inhabituelles sur chaque spectre de CD à 230 - 233 nm (en solution et en présence de vésicules) et l'interaction avec des lipides anioniques augmente l'intensité de ces bandes. Des études sur des peptides riches en Trp (par exemple, l'indolicidine) ont montré que ce signal résulte d'interactions  $\pi-\pi$  («  $\pi-\pi$  stacking ») entre les Trp. Cette bande peut être positive ou négative en fonction de l'orientation des Trp et de leur exposition au solvant [172-174].

### III. Effet de RWI6 sur des membranes modèles

#### III. I. Effet du peptide sur l'intégrité, la distribution et la taille des liposomes

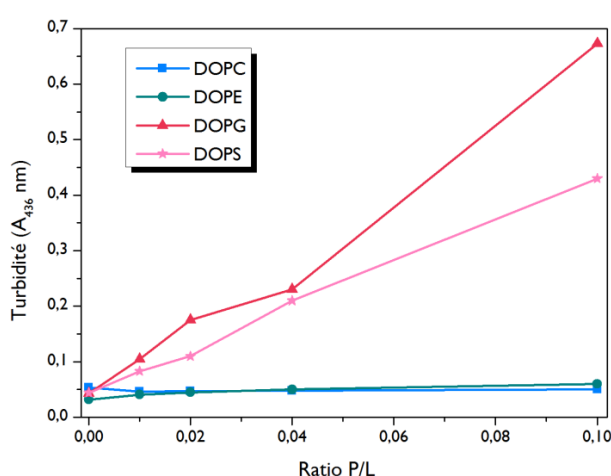
- Turbidité

L'effet du peptide sur l'état (agrégation, fusion) des vésicules de différentes compositions lipidiques a été étudié par mesure de la turbidité en suivant l'absorbance à 436 nm (Figure 34). Les expériences de turbidité nous ont permis de mesurer le changement d'absorbance des vésicules à 436 nm. Le suivi d'absorbance a été réalisé sur 4 types de vésicules: DOPC, DOPE, DOPG et DOPS et la mesure a été réalisée avec des concentrations croissantes de RWI6 permettant d'obtenir des ratios P/L de 1/100 à 1/10.

Nous avons tout d'abord observé que la turbidité ne change pas en présence de vésicules zwitterioniques (DOPC ou DOPE). Cependant, en présence de vésicules anioniques (DOPG et DOPS) nous avons observé une nette augmentation de la turbidité avec une augmentation plus élevée dans le cas du DOPG qu'avec le DOPS.

Ces résultats indiquent qu'une agrégation ou une fusion des vésicules a lieu après ajout de peptide et entraîne la formation de larges objets. Les interactions électrostatiques entre les charges négatives de la membrane et les charges positives du peptide semblent donc importantes et induisent une augmentation de la turbidité de la solution. Ces résultats ne sont pas surprenants car de telles interactions entre CPPs et membranes modèles chargées négativement ont déjà été observées [175; 176]. Cette expérience ne permet cependant pas de déterminer s'il y a agrégation ou fusion des vésicules.

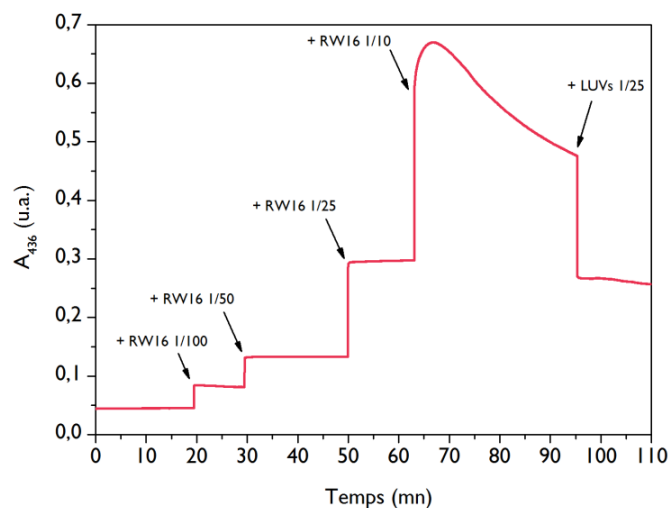
Pour discriminer un comportement de l'autre (fusion ou agrégation des vésicules), nous avons réalisé une cinétique en ajoutant le peptide à des concentrations croissantes sur des vésicules de DOPG et à un ratio P/L où la turbidité est la plus élevée (ratio P/L 1/10) (Figure 35). Dans ce cas, nous avons tout d'abord observé que l'absorbance n'est pas stable dans le temps. En effet, une diminution de l'absorbance apparaît en quelques minutes avec une stabilisation à 30 minutes. Ceci est certainement dû à la sédimentation des vésicules dans l'échantillon. A la fin de ce délai, nous avons rajouté des LUVs afin d'obtenir de nouveau un ratio P/L 1/25 et nous avons pu observer une nette diminution de l'absorbance.



**Figure 34.** Mesure de turbidité des LUVs de différentes compositions lipidiques avec une concentration de 1 mg/ml de lipides et avec des ratios P/L croissants.

Dans le cas où l'augmentation de l'absorbance résulterait d'une fusion des liposomes, l'ajout de LUVs aurait entraîné de nouveau une fusion des liposomes et donc une augmentation de la turbidité. Cependant, l'ajout de liposomes diminue la turbidité de la solution pour revenir au même niveau d'absorbance que le ratio précédent (P/L 1/25).

Cette diminution de turbidité montre que les agrégats de liposomes sont dilués par l'ajout de nouvelles LUVs et cela induit une dissociation des vésicules. En effet, les vésicules agrégées sont déjà saturées en peptide et les oligomères de peptide entreraient en compétition avec ceux déjà liés aux liposomes. Le même phénomène a été observé par Persson et ses collaborateurs et jouerait en faveur d'une agrégation, plutôt qu'une fusion des liposomes [177].



**Figure 35.** Cinétique d'absorbance à 436 nm des LUVs de DOPG avec ajout de différentes concentrations de RW16 (ratios P/L 1/100, 1/50, 1/25, 1/10) puis ajout de LUVs de DOPG (ratio P/L 1/25).

- Diffusion dynamique de la Lumière (DLS)

La variation de la distribution et de la taille de liposomes de différentes compositions (DOPC, DOPE, DOPG, DOPS) a été suivie suite à l'ajout de RW16 à différents ratios P/L (Tableau 8). Dans un premier temps nous avons observé que la taille des liposomes de DOPC ne varie pas en présence de RW16.

P/L ratio	DOPC	DOPE	DOPS	DOPG
0	120 ± 10	145 ± 15	115 ± 5	120 ± 10
1/100	122 ± 12	267 ± 107*	121 ± 11	133 ± 19
1/50	116 ± 6	472 ± 252*	140 ± 30	261 ± 100*
1/25	121 ± 11	757 ± 7	141 ± 31	302 ± 64*
1/10	125 ± 15	759 ± 440*	1235 ± 565*	1244 ± 284*

**Tableau 8.** Distribution de taille des LUVs en présence de différents ratios P/L de RW16. \* pour ces données l'indice de polydispersité (pdi) est supérieur à 0.3.

Dans le cas de liposomes de DOPE une nette augmentation de la polydispersité des vésicules a été observée indiquant la formation de vésicules de différentes tailles. Cela est certainement dû à la capacité des têtes PE à former des phases lipidiques inverses [41]. En effet, nous avons pu observer que le rayon hydrodynamique des liposomes de DOPE sans ajout de peptide est au départ plus large (145 nm) que celui des liposomes de DOPC malgré l'étape d'extrusion à travers une membrane de 100 nm. Cela résulte certainement de la perturbation de l'organisation de la phase lamellaire des liposomes.

Enfin, lorsque le peptide est ajouté à des vésicules anioniques (DOPG ou DOPS) nous avons observé une augmentation significative de la taille des vésicules (jusqu'à 1  $\mu$ m) ainsi qu'une augmentation de la polydispersité des vésicules. La mesure a été réalisée juste après incubation du peptide avec les liposomes et nous avons pu observer à l'œil nu une augmentation de la turbidité immédiatement après incubation confirmant ainsi les résultats de turbidité observés. Après quelques jours, un dépôt lipidique s'est formé au fond des tubes. On peut donc affirmer que les interactions électrostatiques jouent un rôle important lors de l'interaction du peptide avec les membranes modèles. Un comportement similaire a été observé précédemment dans le cas de RL16, un peptide avec la même séquence que RW16 mais avec des Leu à la place des Trp [107]. D'autres CPPs tels que la pénétratine, des CPPs riches en Arg ou des AMPs qui possèdent un grand nombre de résidus chargés montrent aussi d'importantes interactions électrostatiques avec les lipides anioniques [107; 175; 178; 179].

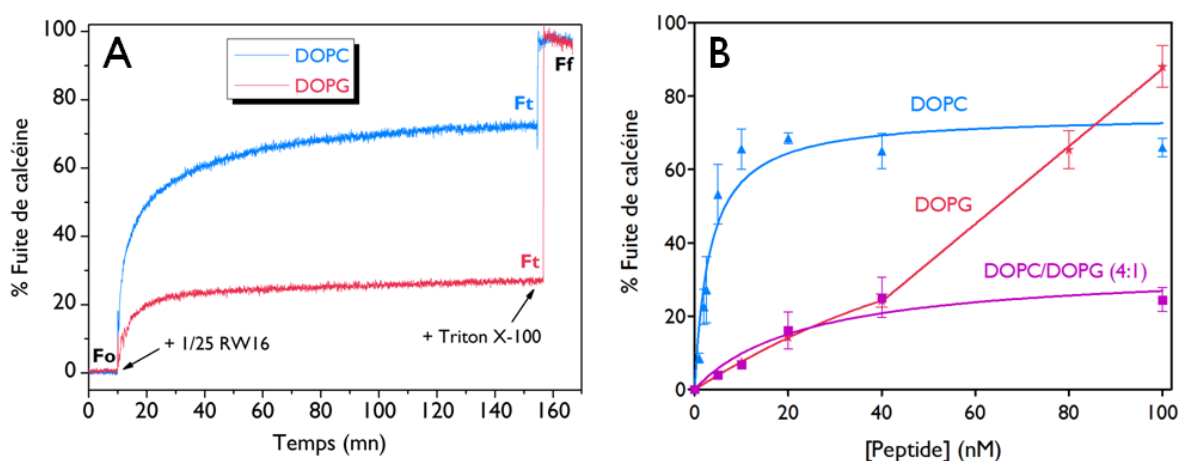
- Fuite de calcéine

Nous avons vérifié la perturbation de l'intégrité des membranes (formation de pores) suite à l'action de RW16 grâce au suivi de la fuite de calcéine sur des liposomes de différentes compositions. Le peptide RW16 a été ajouté à des LUVs de DOPC, DOPG et DOPC/DOPG (4:1 mol:mol) chargées en calcéine et en variant les ratios P/L de 1/1000 à 1/10. Pour ces expériences, des ratios bien inférieurs à ceux utilisés pour les autres expériences ont été appliqués car une fuite de calcéine a été observée dès l'ajout de très faibles concentrations de peptide (P/L 1/1000).

Des LUVs composées de lipides insaturés ont été utilisées car les LUVs chargées en calcéine fuient si la membrane ne se trouve pas en phase fluide. En effet, la même expérience a aussi été réalisée avec des lipides saturés et nous avons observé que les LUVs se sont vidées de la calcéine à cause de la rigidité de la membrane.

Nous avons observé que la cinétique de fuite de calcéine après ajout de peptide est très rapide, les liposomes commencent à fuir en quelques secondes, puis atteignent une saturation en 2h (Figure 36A). Lorsque le peptide est ajouté à des LUVs de DOPC, une forte augmentation du pourcentage de fuite de calcéine a été observée dès le ratio P/L 1/1000 jusqu'à atteindre 75% de fuite même avec une concentration de peptide ajoutée très faible (40 nM; ratio P/L 1/25) (Figure 36B).

Les données de fuite de calcéine pour les vésicules de DOPC ont été ajustées grâce à une courbe hyperbolique qui nous a permis de déterminer une concentration de 50 % du maximum d'activité du peptide. Cette valeur est de  $3.2 \pm 0.7$  nM pour des liposomes de DOPC. Le processus de fuite semble coopératif, comme cela a été observé par d'autres laboratoires. En effet, il a été montré qu'une insertion coopérative du peptide peut avoir lieu. Quelques molécules de peptides pourrait créer un déséquilibre de masse à la surface de la membrane et induire la déstabilisation de la membrane précédant l'insertion du peptide [180; 181]. Ce déséquilibre de masse a aussi été montré par des simulations de dynamique moléculaire comme étant un mécanisme responsable de la perturbation membranaire conduisant à des défauts membranaires [182; 183].



**Figure 36. (A)** Cinétique de la fuite de calcéine pour des liposomes de DOPC, DOPG et DOPC/DOPG. La fuite de calcéine est exprimée en pourcentage pour un ratio P/L 1/25 (40 nM) par rapport à la fuite de calcéine maximale observée en présence de Triton X-100. **(B)** Pourcentage de fuite de calcéine pour chaque liposome de composition différente et pour des concentrations croissantes de RW16.

Le comportement des liposomes de DOPG en présence de peptide apparaît plus compliqué dans son interprétation. En effet, à de faibles concentrations (inférieures à 40 nM, P/L 1/25) il y a moins de fuite de calcéine qu'avec les liposomes de DOPC et la réponse est hyperbolique et bien moins coopérative. A des concentrations élevées (supérieures à 40 nM), la fuite de calcéine est directement proportionnelle à la concentration de peptide et on atteint 100% de fuite de calcéine à des concentrations supérieures à 100 nM.

Pour des vésicules de DOPC/DOPG (4:1) le profil de la fuite de calcéine est très similaire à celui des liposomes de DOPG à des faibles concentrations de peptides (inférieures à 40 nM) indiquant que le peptide interagit via des interactions coopératives engageant les lipides anioniques (20%) des LUVs. Lorsque tous les lipides anioniques sont saturés (20% de lipides anioniques) par le peptide, celui-ci interagit avec les lipides zwitterioniques de manière coopérative comme avec les liposomes de DOPC. Ceci tend à montrer que le peptide induit une séparation des lipides en interagissant à la surface de la membrane et pourrait suggérer que plus la composition de la membrane est complexe et variée, moins le peptide est susceptible de perturber la membrane.

Ces effets sont principalement dûs à des interactions spécifiques entre les peptides et les têtes polaires des lipides, suggérant une compétition entre les forces électrostatiques et hydrophobes mises en jeu. Par exemple, pour une membrane composée de lipides zwitterioniques, le peptide est probablement inséré plus profondément dans la partie hydrophobe de la membrane (à travers des interactions hydrophobes entre la partie du peptide riche en Trp et les queues hydrophobes des lipides) conduisant à une fuite importante de la calcéine. Dans le cas de liposomes composés de lipides anioniques à 100 %, l'attraction électrostatique entre le peptide et les lipides (le peptide expose ses charges aux têtes polaires des lipides) pourrait immobiliser le peptide dans la région des têtes polaires lui empêchant une insertion plus profonde. Des observations similaires ont été décrites pour la melittine, le peptide du venin de guêpe [184].

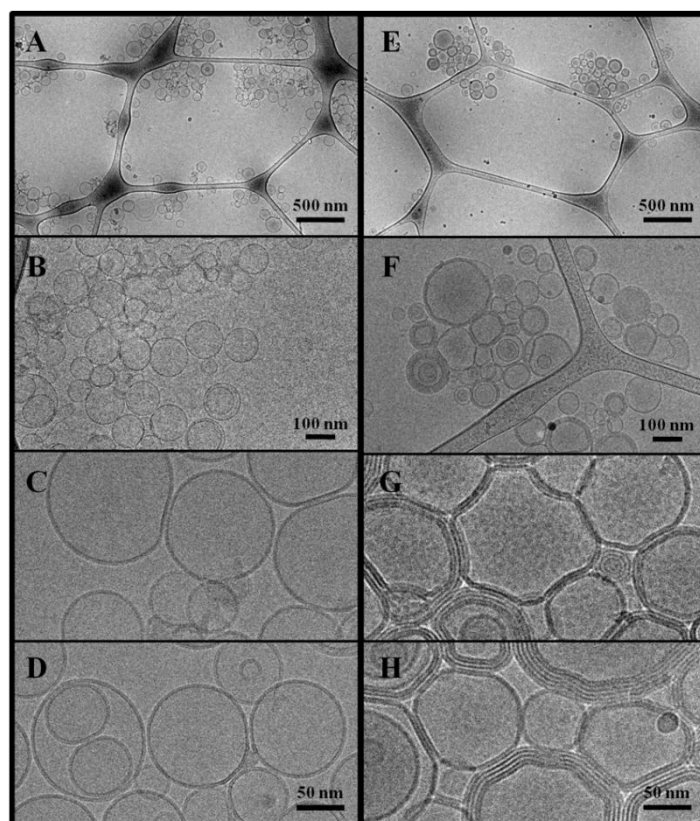
- Cryo-Microscopie électronique à Transmission (Cryo-MET)

La cryo-microscopie électronique à transmission (Cryo-MET) a été réalisée en collaboration avec les Dr. P. Bonnafous et O. Lambert au sein du laboratoire CBMN.

La cryo-MET nous a permis de fournir des informations structurales morphologiques et supramoléculaires sur les assemblages liposomes-RWI6, essentiellement dans le contexte de perturbation des membranes et d'agrégation des vésicules. La Figure 37 montre des images représentatives de liposomes de DOPC (A, B, C, D) et de DOPG (E, F, G, H) en présence de RWI6 avec un ratio P/L de 1/25. On observe sur les Figure 37C et D que la morphologie des liposomes zwitterioniques n'est pas affectée par l'ajout de peptide.

Dans le cas des lipides anioniques, nous avons observé un résultat différent. En effet, le peptide déforme largement la structure des liposomes et crée une adhésion entre les vésicules avec une grande déformation de la courbure des liposomes (Figure 37G et H). Le peptide augmente le contact entre les liposomes et conduit à leur déformation en créant un arrangement plus compact. Le peptide semble agir comme une colle entre les liposomes anioniques diminuant ainsi la tension de courbure de la membrane. De plus, dans le cas des liposomes anioniques, ceux-ci sont plus concentrés dans une région restreinte de la grille et semblent former des agrégats (Figure 37E) tandis qu'avec les liposomes zwitterioniques, ils sont plus largement distribués sur la grille (Figure 37A).

Cela confirme les résultats de DLS et de turbidité montrant que RWI6 conduit à une agrégation des liposomes anioniques conduisant à leur déformation. Si l'on compare ces données avec celles décrites précédemment sur la pénétratine, le peptide dont est dérivé RWI6, on peut conclure que ces deux peptides perturbent l'organisation lipidique et la courbure de la membrane [185; 186].



**Figure 37.** Images de cryo-MET obtenues sur des liposomes de DOPC (A, B, C, D) et de DOPG (E, F, G, H) en présence de RWI6 (40  $\mu$ M).

#### IV. Perturbation de l'organisation lipidique

- Calorimétrie différentielle à balayage (DSC)

L'interaction de RWI6 avec des phospholipides a été étudiée en observant les modifications des transitions de phases de la phase gel  $L\beta$  à la phase gel ondulée  $P\beta'$  (température de pré-transition,  $T_{pre}$ ) et de la phase gel ondulée  $P\beta'$  à la phase liquide  $L\alpha$  (température de transition principale,  $T_m$ ) de vésicules de différentes compositions lipidiques suite à l'ajout de RWI6 à différents ratios P/L.

La température de transition de phase des lipides ainsi que les autres propriétés thermodynamiques (enthalpie, coopérativité de transition, etc) sont sensibles à la présence de composés extérieurs. La modification de ces paramètres par le peptide renseigne sur l'interaction P/L.



Pour nos expériences nous avons choisi de travailler avec des lipides saturés de type myristoyl (C14:0) car leur température de transition de phase est proche de la température ambiante et supérieure à 0°C, ce qui facilite leur préparation et permet leur utilisation en DSC. Ce sont les raisons pour lesquelles ils sont souvent utilisés avec la technique de DSC malgré le fait qu'ils sont peu présents dans les membranes biologiques. De plus, les expériences ont été réalisées sur des MLVs plutôt que sur d'autres types de vésicules (LUVs, SUVs) car les MLVs donnent un signal plus homogène et avec une plus forte intensité en DSC [187]. Les thermogrammes sont représentés dans la Figure 38 et les paramètres thermodynamiques sont donnés dans le Tableau 9.

Les liposomes de DMPC possèdent deux événements endothermiques: une transition vers 14°C qui découle de la conversion de la phase  $L\beta$  à la phase  $P\beta'$ , et une transition plus énergétique vers 24°C qui résulte de la conversion de la phase  $P\beta'$  à la phase  $L\alpha$ . Lorsque RW16 est ajouté aux vésicules de DMPC (Figure 38A et Tableau 9) le peptide diminue l'enthalpie de pré-transition ( $\Delta H_{pre}$ ) dès l'ajout d'un faible ratio P/L (1/100). Cette diminution de l'enthalpie résulte de la modification de l'orientation des têtes polaires des lipides et montre qu'elles interagissent avec le peptide. RW16 ne change pas significativement la température de transition principale mais réduit son enthalpie ( $\Delta H_m$ ) et augmente la largeur à mi-hauteur du pic de l'enthalpie ( $\Delta T_{1/2}$ ).

Un changement d'enthalpie est la conséquence de la disruption d'interactions Van der Waals entre les chaînes hydrocarbonées des lipides. Cela montre que le peptide est capable de s'insérer entre les chaînes d'acides gras et de réduire la coopérativité de la transition (qui se reflète dans l'augmentation du  $\Delta T_{1/2}$ ).

En terme de pré-transition, RW16 affecte plus celle de DMPG que celle de DMPC puisqu'elle l'abolit complètement, dès l'ajout de faibles ratios P/L (1/100) (Figure 38B et Tableau 9). Ceci résulte certainement des interactions électrostatiques plus favorables entre les charges négatives des lipides et les charges positives du peptide. Lorsque la concentration de peptide augmente, nous avons observé un dédoublement du signal de l'enthalpie de la  $T_m$  qui suggère une séparation de phase et la coexistence de domaines riches et pauvres en peptide dans la bicouche [188; 189].

De plus, nous avons observé une augmentation du  $\Delta T_{1/2}$  qui résulte d'une diminution de la coopérativité de la transition en raison de la disruption des interactions Van der Waals entre les chaînes d'acides gras lipidiques découlant de l'insertion du peptide dans le cœur de la membrane.

Le rôle des interactions électrostatiques peut être étudié en comparant l'effet du peptide sur les membranes zwitterioniques et anioniques pures, mais des vésicules composées de mélanges lipidiques avec une température de transition de phase suffisamment différente ont été utilisées afin d'étudier le recrutement potentiel des lipides lors de l'interaction du peptide avec la membrane [96; 190; 191].

Nous avons choisi de travailler avec des vésicules composées de DMPG/DPPC (60:40), la température de transition principale étant de 24°C et de 41°C pour le DMPG et le DPPC respectivement. La Figure 38C représente le thermogramme pour ce type de vésicule, la  $T_{pre}$  est de 19°C et la  $T_m$  vers 31°C. Ces lipides forment un mélange miscible non idéal et donc un pic de transition qui est plus large que celui d'un seul composé est observé.

Lorsque le peptide est ajouté à ces vésicules, nous avons observé un élargissement du pic de transition ainsi qu'une séparation des pics à partir d'un ratio P/L de 1/50. Un pic est déplacé vers des températures plus élevées approchant la  $T_m$  du DPPC (41°C). Cela signifie que le peptide conduit à une ségrégation du DPPC du mélange lipidique. Par conséquent, l'autre pic observé à de plus basses températures correspond à une transition de phase de DMPG perturbée par le peptide. Cette  $T_m$  de DMPG riche en peptide est éloignée de la  $T_m$  pure de DMPG (environ 10 °C de différence à un ratio P/L de 1/25) si l'on compare la différence de  $T_m$  entre la phase DPPC-riche en peptide et DPPC pure (moins de 2 °C de différence). Cela indique que la phase DMPG riche en peptide est plus affectée que celle de DPPC enrichie en peptide.

Il faut noter que chaque composant enrichi en peptide ne possède pas une  $T_m$  exactement similaire à celle de sa  $T_m$  pure du fait que les domaines formés ne sont pas composés d'un lipide principal mais toujours d'un mélange de lipides avec une petite proportion de l'autre lipide.

Les résultats pointent vers une interaction préférentielle de RWI6 pour le domaine riche en DMPG et une ségrégation du DPPC. Les forces d'interaction qui guident cette préférence pour le DMPG peuvent être soit électrostatiques et/ou une plus forte fluidité du lipide comme cela a été observé lors d'études précédentes au cours desquelles une interaction préférentielle du peptide se déroulait avec les lipides ayant la plus basse  $T_m$  [159].

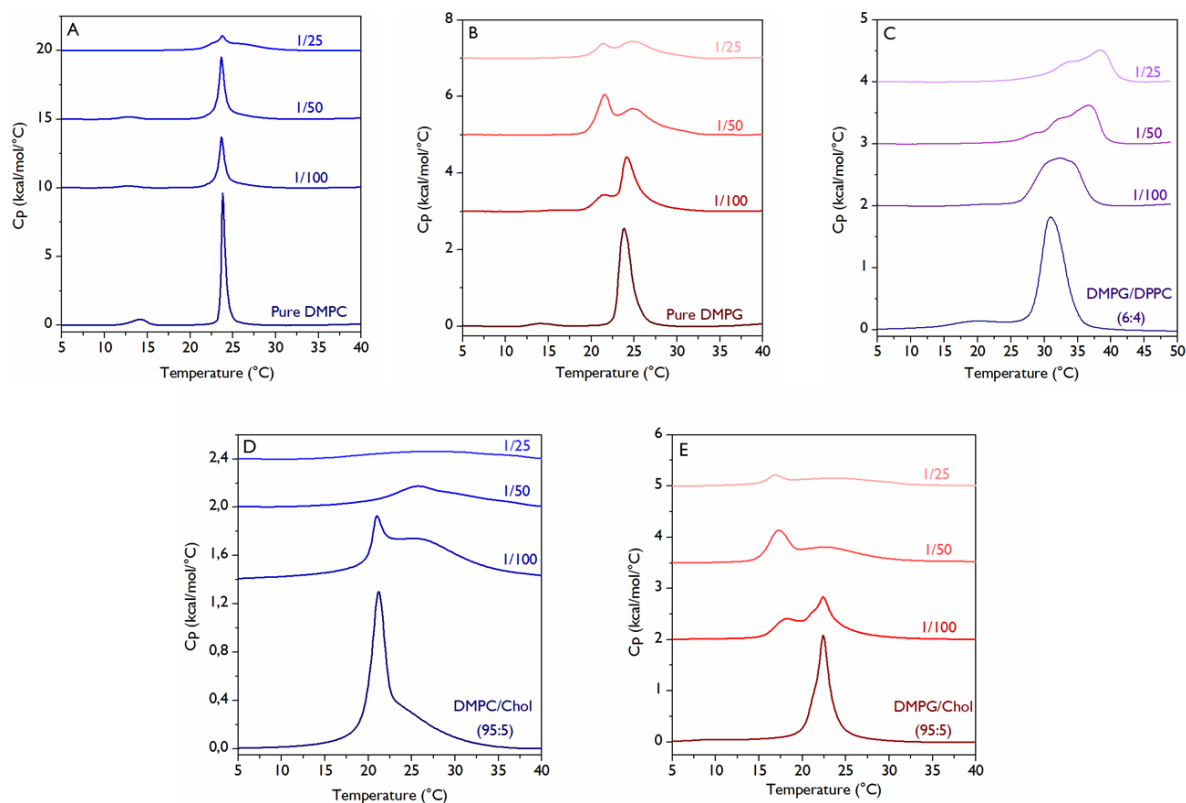
Des études réalisées par d'autres laboratoires et utilisant la DSC ont aussi montré une interaction préférentielle du peptide avec un type de lipide dans des vésicules de compositions lipidiques mélangées et en conséquence une ségrégation de l'autre composé lipidique [96; 190; 191].

Lorsque le cholestérol est présent dans les vésicules de DMPC (5 %), la pré-transition n'est plus observée (Figure 38D et Tableau 9). Le cholestérol, en fluidifiant la membrane, diminue fortement l'enthalpie de transition de phase en abolissant le signal de pré-transition et élargissant la  $T_m$ . La transition de phase principale (vers 21 °C) est séparée en deux pics lorsque le peptide est ajouté à des concentrations croissantes, l'enthalpie diminue fortement et le  $\Delta T_{1/2}$  augmente.

Dans ce cas, la diminution d'enthalpie est plus forte (diminution de 80 % de l'enthalpie) que pour des vésicules de DMPC seul (diminution de 46 % de l'enthalpie). Cette diminution plus importante de la coopérativité de la  $T_m$  observée en présence de cholestérol montre que le peptide affecte plus l'organisation des chaînes d'acides gras des lipides en présence de cholestérol. Cela suggère que le cholestérol, en induisant une phase liquide ordonnée ( $L_o$ ) de la membrane, favorise l'insertion du peptide dans la bicouche. Dans le cas de vésicules de DMPG/Chol (95:5 mol:mol) (Figure 38E et Tableau 9), le comportement des lipides avec des concentrations croissantes de peptide est pratiquement le même que celui observé pour le DMPG seul en terme d'enthalpie et de coopérativité de la transition. Ceci montre que le cholestérol ne change pas significativement le mode d'interaction de RWI6 avec le DMPG et suggère que le peptide s'insère moins profondément dans le cœur hydrophobe des membranes anioniques par rapport aux membranes zwitterioniques. Ces interprétations sont en accord avec les expériences de fuite de calcéine sur des LUVs composées de DOPC/DOPG et renforcent la théorie d'une ségrégation des lipides.

		Pre-transition				Transition principale			
		T <sub>pre</sub> (°C)	ΔH (kcal/mol)	ΔS (cal/K.mol)	ΔT <sub>1/2</sub> (°C)	T <sub>m</sub> (°C)	ΔH (kcal/mol)	ΔS (cal/K.mol)	ΔT <sub>1/2</sub> (°C)
<b>DMPC</b>	Lipides	14.2	1.4	3	2	23.8	8.7	29	0.5
	I/100 RW16	12.7	0.6	2	2.6	23.7	6.2	21	0.8
	I/50 RW16	12.8	0.5	2	2.5	23.7	5.4	24	0.8
	I/25 RW16	12.9	0.1	0	3	23.7/26.5	2.9/ 2.5	9.8/ 8.3	2.2/ 4.2
<b>DMPG</b>	Lipides	14.3	0.3	1	3	23.8	6	20	1.5
	I/100 RW16	-	-	-	-	21.5/24.1	0.6/4.8	2/16	1.4/2.3
	I/50 RW16	-	-	-	-	21.6/24.8	2.2/4.4	7.5/15	1.5/4.2
	I/25 RW16	-	-	-	-	21.4/25	1.3/3.7	4.4/12	1.5/5.2
<b>DMPG /DPPC (60:40)</b>	Lipides	19.1	0.4	1	5.5	30.9	9	30	3.8
	I/100 RW16	-	-	-	-	32.2	6.5	21	6.9
	I/50 RW16	-	-	-	-	32.9/ 36.4	4.4/2.3	14/11	6.7/2.8
	I/25 RW16	-	-	-	-	34/ 38.4	2.82/2.13	9.2/6.8	5.94/2.97
<b>DMPC /Chol (95:5)</b>	Lipides	-	-	-	-	21.2/24.9	3.4/2.7	12/9.1	1.8/7.1
	I/100 RW16	-	-	-	-	21.1/25.8	0.7/6.2	2.4/21	1.4/10.9
	I/50 RW16	-	-	-	-	25.6/31.6	1.8/0.6	6/2	7.3/7.1
	I/25 RW16	-	-	-	-	27.3	3.5	12	22.9
<b>DMPG /Chol (95:5)</b>	Lipides	13.6	nd	nd	nd	22.4	5.8	20	1.9
	I/100 RW16	-	-	-	-	22.4/18	3.9/ 1.3	13/4.4	3.4/2.6
	I/50 RW16	-	-	-	-	23.2/17.3	4.1/2	14/6.9	8.6/2.2
	I/25 RW16	-	-	-	-	23.8/16.9	3.4/0.5	11/1.7	12.5/1.9

**Tableau 9.** Paramètres thermodynamiques obtenus à partir des expériences de DSC sur des vésicules de compositions lipidiques différentes en absence et en présence de concentrations croissantes de RW16. - signifie que la transition n'était pas détectable, nd signifie qu'il n'a pas été possible de calculer le paramètre thermodynamique.



**Figure 38.** Thermogrammes de DSC de MLVs de DMPC **(A)**, DMPG **(B)**, DMPG/DPPC **(C)**, DMPC/Chol **(D)** et DMPG/Chol **(E)** en absence et en présence de concentrations croissantes de RW16.

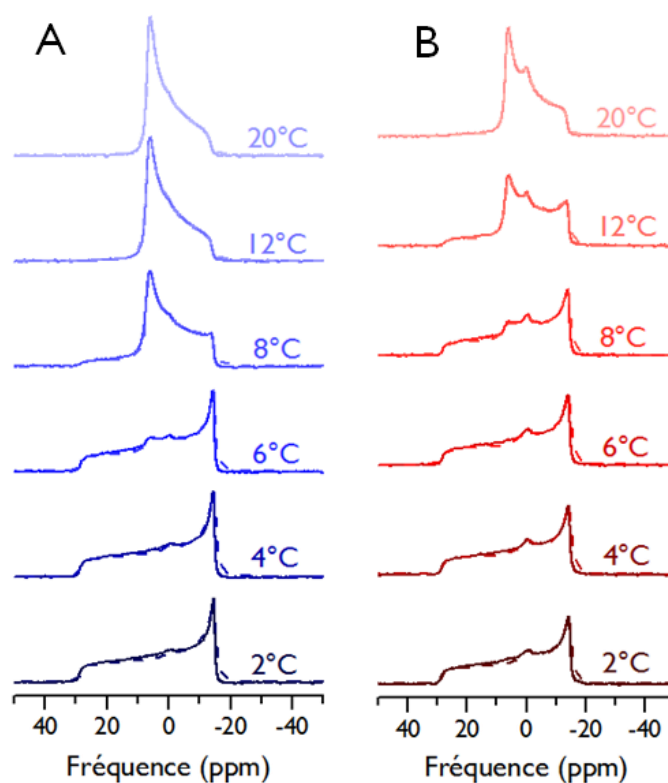
### • $^{31}\text{P}$ -RMN

Afin de mieux comprendre le comportement des vésicules de DOPE en présence de RW16 (pas de changement de turbidité mais une augmentation de la taille des vésicules observée en DLS), nous avons réalisé des expériences de RMN du  $^{31}\text{P}$  sur des MLVs de DOPE en absence et en présence de RW16 (Figure 39).

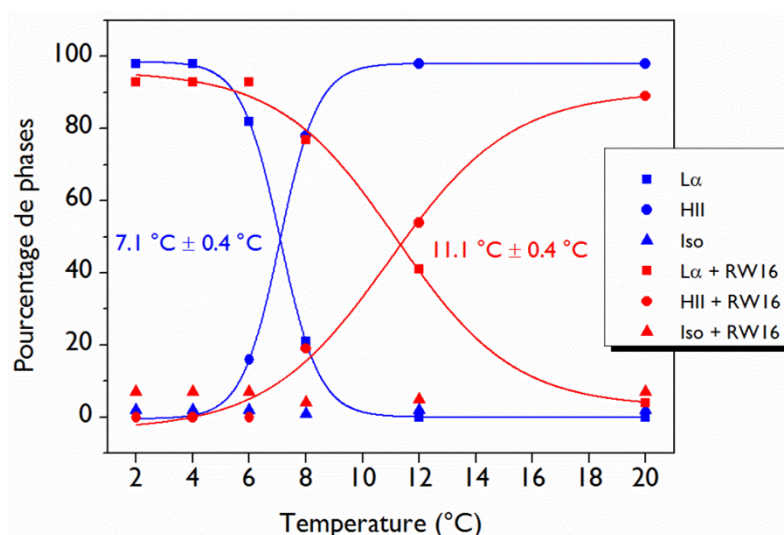
Le peptide a été ajouté à des liposomes à un ratio P/L de 1/100 et la température a été balayée entre 2 et 20 °C. Nous avons observé que la transition de la phase lamellaire à la phase hexagonale de type II ( $H_{II}$ ) se déroule à  $7,1\text{ °C} \pm 0,4\text{ °C}$  en absence de peptide et à  $11,1\text{ °C} \pm 0,4\text{ °C}$  en présence de peptide (Figure 40). Cela montre que le peptide stabilise la phase lamellaire, ce qui pourrait être expliqué par une intercalation du peptide entre les têtes polaires des lipides sans insertion dans le cœur hydrophobe de la membrane.

Cette localisation viendrait contrecarrer la tendance naturelle des têtes PE à induire une courbure négative locale et créer une phase hexagonale  $H_{II}$ .

Il apparaît aussi que le peptide entraîne la formation d'une petite proportion de phases isotropes (pic fin centré à 0 ppm) montrant l'apparition d'objets isotropes de taille micellaire. Cela suggère que RWI6 entraîne en plus une restructuration limitée, mais détectable, de la membrane.



**Figure 39.** Spectres de RMN du  $^{31}\text{P}$  de MLVs de DOPE en absence **(A)** et en présence de RWI6 à un ratio P/L de 1/100 **(B)**. La température a varié entre 2°C et 20 °C. Les spectres expérimentaux sont représentés par les lignes pleines et les superpositions théoriques sont représentées par les lignes pointillées.



**Figure 40.** Diagramme de transition de phases des MLVs de DOPE en absence (courbe bleue) et en présence de RWI6 (courbe rouge).

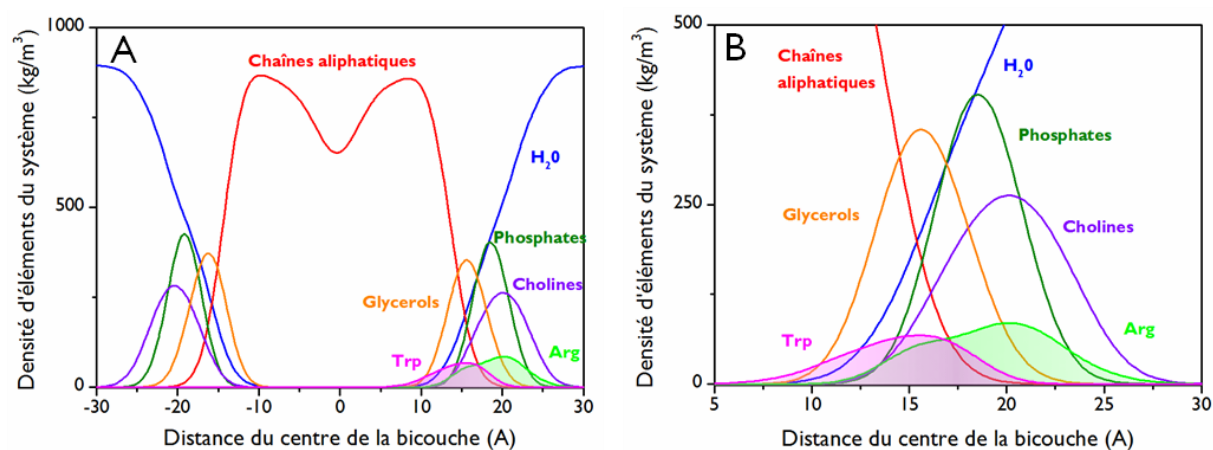
## V. Insertion du peptide dans les membranes

- Simulation de Dynamique moléculaire (MD)

Afin de mesurer le degré d'insertion et l'angle d'inclinaison de RWI6 dans la membrane et plus particulièrement dans des membranes zwitterioniques, des simulations de dynamique moléculaire (MD) de peptide inséré dans une membrane de DOPC ont été réalisées au sein de l'équipe de P. Fuchs (DSIMB, Univ. Paris Diderot). Nous avons pu ainsi calculer la densité des éléments du système en fonction de leur distance par rapport au centre de la bicouche. La Figure 41A représente la densité des éléments pour chaque composant de la bicouche ainsi que pour les Arg et Trp de RWI6 et la Figure 41B agrandit la zone de localisation du peptide.

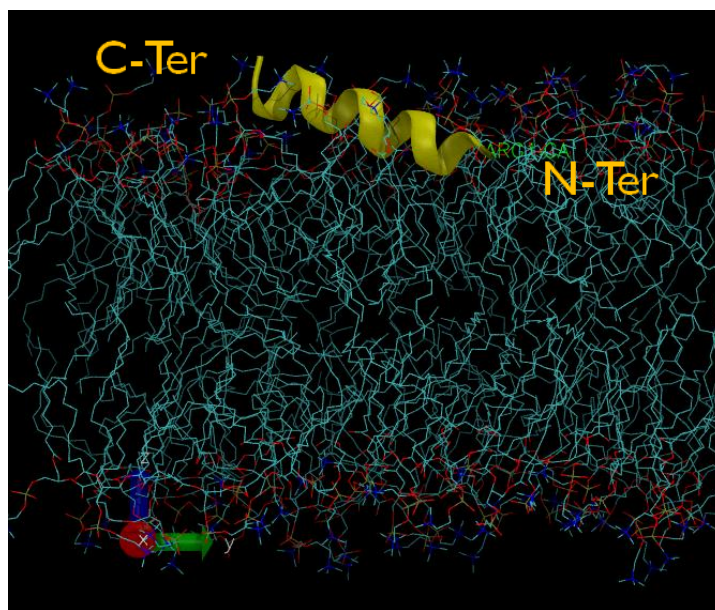
D'après les graphes de densité des éléments, nous avons pu voir que le peptide et plus précisément les Trp sont situés juste en dessous du niveau des glycérols des phospholipides donc à l'interface entre la région polaire et hydrophobe des lipides. Cela n'est pas étonnant lorsque l'on connaît les propriétés interfaciales de ces résidus. Les Arg sont situées proches des têtes cholines des phospholipides et confirment la présence d'une interaction électrostatique entre les Arg et les charges négatives présentes à la surface de la membrane. Ces résultats ont montré que RWI6 s'insère à environ 15 Å du centre de la bicouche. Cela démontre que le peptide s'insère dans la bicouche et forme des interactions hydrophobes avec les chaînes d'acides gras. Cela perturbe suffisamment la membrane de DOPC pour créer une fuite de calcéine comme nous avons pu le voir précédemment.

Grâce à l'analyse de ces données de modélisation, nous avons pu calculer l'angle d'orientation du peptide dans la membrane qui est de  $75^\circ$  par rapport à la normale à la bicouche, la partie N-Terminale étant la partie la plus insérée (Figure 42). Cela est en accord avec des calculs réalisés précédemment pour la pénétratine montrant que les Trp de la pénétratine sont situés sous les glycérols des phospholipides (pour une bicouche zwitterionique de POPC) et que le peptide est orienté de manière presque parallèle à la membrane avec un angle de  $80^\circ$ - $90^\circ$  [192; 193].



**Figure 41.** Carte de densité des éléments d'une bicouche de DOPC en présence d'un ratio de 1/25 de RWI6 (A) et agrandit sur la zone de densité du peptide (B). Le temps de simulation est de 200 ns. Simulation tout-atome: 100 molécules de DOPC, 1 RWI6, 37°C, 300ns. Le peptide est pré-inséré à la surface de la membrane en conformation hélicoïdale.



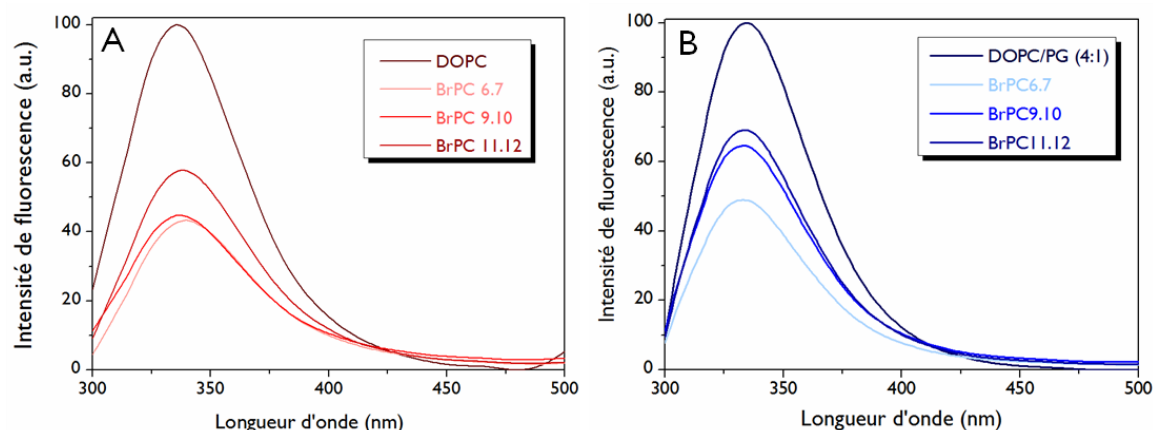


**Figure 42.** Simulation de la position du peptide dans la membrane. Simulation tout-atome: 100 molécules de DOPC, 1 RW16, 37°C, 300ns. Le peptide est pré-inséré à la surface de la membrane en conformation hélicoïdale.

- Fluorescence du Trp en présence de vésicules lipidiques bromées

Afin d'étudier l'insertion du peptide dans les membranes zwitterioniques et anioniques, nous avons étudié le quenching des Trp en présence de vésicules composées de 30 % de lipides bromés, possédant des bromes sur 3 positions au niveau de la chaîne lipidique, sur le carbone 6 et 7 pour le BrPC(6,7), sur les carbones 9 et 10 pour le BrPC(9,10) et sur les carbones 11 et 12 pour le BrPC(11,12). Des LUVs de DOPC et de DOPC/DOPG (4:1 mol:mol) ont été préparées seules ou avec 30 % de BrPC(6,7), BrPC(9,10) ou BrPC(11,12) (les proportions pour les LUVs zwitterioniques sont de DOPC/BrPC 7:3 mol:mol et pour les LUVs anioniques de DOPC/DOPG/BrPC 5:2:3 mol:mol:mol).

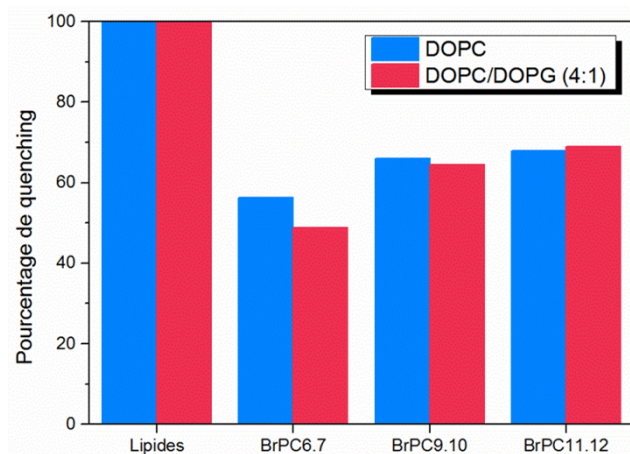
La Figure 43 représente les spectres de fluorescence du Trp en présence de vésicules composées de lipides pures ou de lipides bromés.



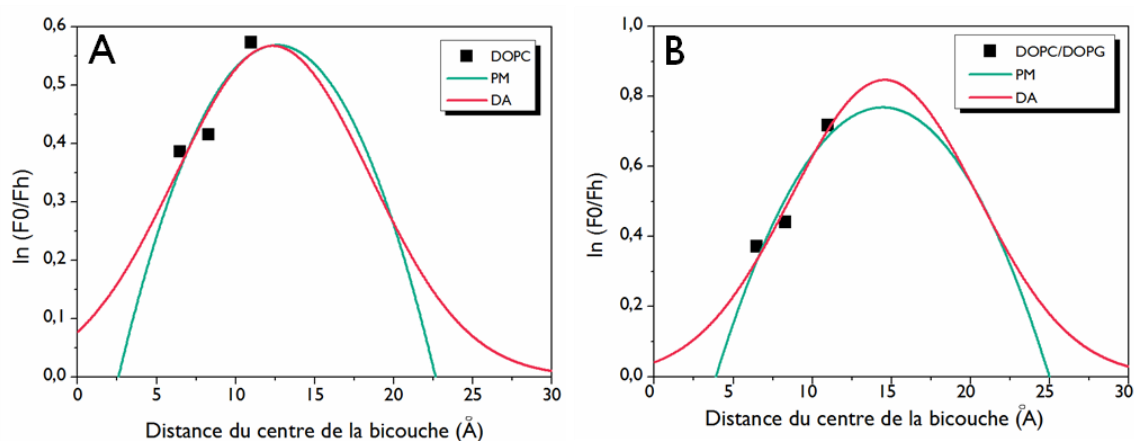
**Figure 43.** Spectres de quenching de fluorescence du Trp de RWI6 (0.5  $\mu$ M) en présence de vésicules de DOPC/BrPC (7:3) **(A)** et de DOPC/DOPG/BrPC (5:2:3) **(B)**.

La Figure 44 représente le diagramme de pourcentage d'inhibition de fluorescence (« quenching ») en fonction des vésicules et des lipides bromés, pour des vésicules de DOPC et de DOPC/DOPG (4:1). A partir des pourcentages de « quenching » (Figure 45), nous avons pu calculer la distance moyenne des Trp par rapport au centre de la bicouche grâce aux équations d'Analyse de distribution (DA) et de la méthode Parallax (PM) (décrites dans le Chapitre V, Matériels & Méthodes). Nous avons ainsi observé que la profondeur des Trp par rapport au centre de la bicouche dans des vésicules de DOPC est d'environ 13 Å et d'environ 15 Å pour des liposomes de DOPC/DOPG (4:1).

Ces données rejoignent les résultats de simulation MD qui révèlent que les Trp sont situés à environ 15 Å du centre de la bicouche. Cela confirme que le peptide semble plus inséré dans une bicouche de DOPC et est corrélé avec les résultats de fuite de calcéïne où le peptide induit une perturbation plus importante des membranes zwitterioniques.



**Figure 44.** Pourcentage de « quenching » de RW16 en présence de vésicules de DOPC ou de DOPC/BrPC (7:3) déterminé par spectroscopie de fluorescence.



**Figure 45.** Ajustements de courbe par la méthode d'Analyse de Distribution (DA) ou Parallax (PM) pour des vésicules de DOPC (A) et de DOPC/DOPG (4:1) (B).

- Inhibition de fluorescence par l'acrylamide

L'insertion des Trp de RW16 et de la pénétratine dans des LUVs de DOPC a été plus spécialement étudiée par la méthode d'inhibition de fluorescence du Trp en utilisant l'acrylamide comme inhibiteur soluble. Ces expériences nous ont permis de comparer l'insertion des Trp de RW16 dans une bicouche zwitterionique par rapport à un peptide similaire, la pénétratine. Ces données d'insertion ont déjà été réalisées mais les conditions expérimentales diffèrent des nôtres (type de solution tampon, ratio P/L, ...) [194].

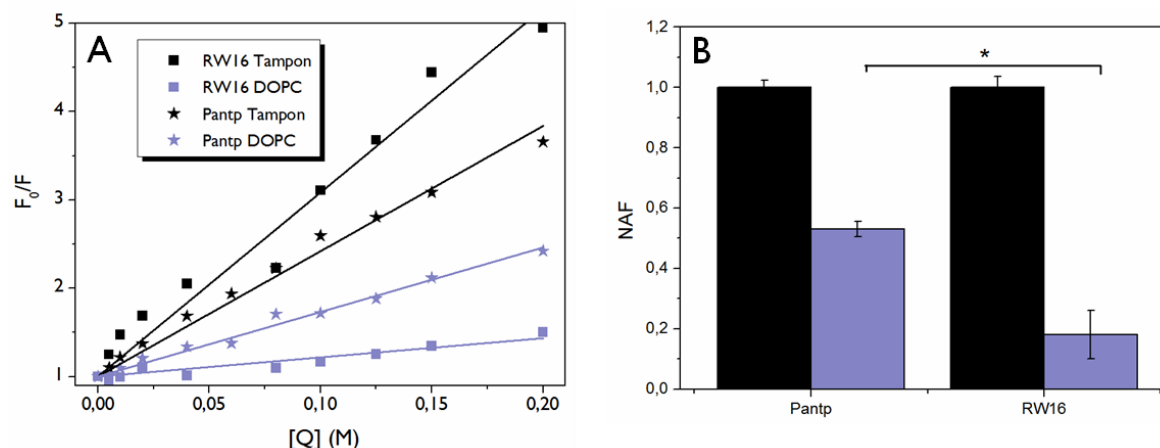
Pour cela des titrations du peptide ont été réalisées en absence et en présence de LUVs de DOPC et à des concentrations croissantes d'acrylamide. Lorsque le peptide, et plus particulièrement les Trp sont enfouis profondément dans la membrane, ils ne sont pas accessibles à l'acrylamide, donc l'inhibition sera faible ou nulle, tandis que si le peptide n'est pas inséré profondément dans la bicouche, les Trp sont accessibles au milieu aqueux et le quenching par l'acrylamide est plus intense. A partir de ces expériences nous avons pu déterminer le coefficient de Stern-Volmer ( $K_{SV}$ ) et cette valeur a été normalisée par rapport au  $K_{SV}$  en milieu aqueux pour faciliter la comparaison des peptides entre eux (paramètre naf pour "Normalized Accessibility Factor") [195; 196] (Tableau 10). Plus le facteur d'accessibilité est élevé, plus le peptide est exposé au solvant, au contraire plus ce facteur est bas, plus le peptide est enfoui dans la membrane.

Les taux d'inhibition ( $F_0/F$ ) exprimés par rapport à la fluorescence initiale ( $F_0$ ) et en fonction de la concentration d'acrylamide sont représentés pour les deux peptides dans la Figure 46A et le facteur d'accessibilité normalisé (naf) est représenté dans la Figure 46B.

Les résultats concernant RWI6 montrent que le peptide est plus enfoui dans la membrane que la pénétratine. Il faut noter que RWI6 possède 6 Trp tandis que la pénétratine ne possède que 2 Trp. Le résultat d'inhibition de fluorescence est donc la moyenne d'enfouissement pour les 6 Trp de RWI6. Cela rejoint les données de MD et de fluorescence du Trp en présence de lipides bromés montrant que RWI6 est profondément enfoui dans des vésicules de DOPC avec une distance du centre de la bicouche d'environ 13Å (c'est à dire à environ 7 Å des têtes polaires de lipides).

Peptides	$K_{SV}$ ( $M^{-1}$ )		naf	
	Tampon	DOPC	Tampon	DOPC
<b>Pénétratine</b>	$14.2 \pm 0.3$	$7.5 \pm 0.2$	1	$0.53 \pm 0.03$
<b>RWI6</b>	$16.6 \pm 0.7$	$3 \pm 0.2$	1	$0.18 \pm 0.07$

**Tableau 10.** Constantes de Stern-Volmer ( $K_{SV}$ ) déterminées par la méthode de quenching de fluorescence du Trp par l'acrylamide et facteurs d'accessibilité normalisés naf ( $K_{SV}$  des peptides en présence de vésicules par rapport au  $K_{SV}$  des peptides en tampon).



**Figure 46. (A)** Taux d'inhibition de fluorescence pour RWI6 et pour la pénétratine dans le tampon et en présence de DOPC. **(B)** Facteurs d'accessibilité normalisés (naf) pour la pénétratine et RWI6 en présence de liposomes de DOPC. La significativité a été testée par un test de Student : \* 0,01 < p < 0,05.

- Résonance Magnétique Nucléaire du proton ( $^1\text{H}$ -RMN)

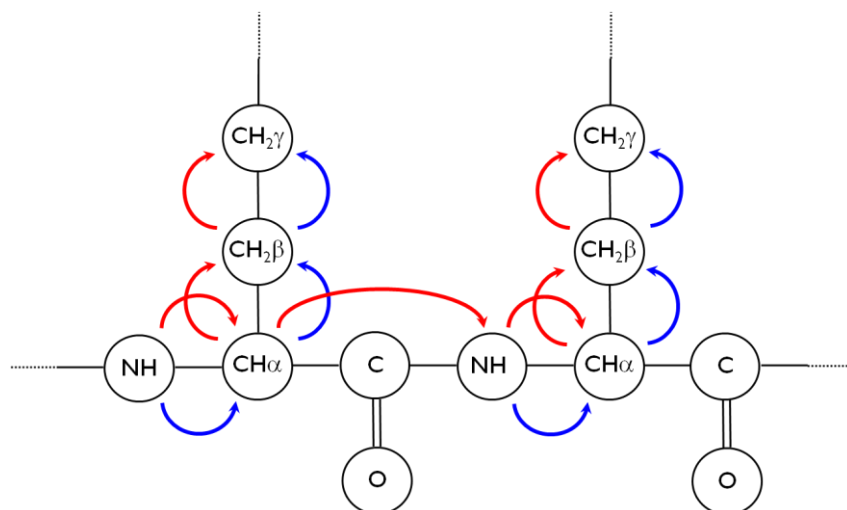
Afin d'étudier la profondeur d'insertion de chaque acides aminés et l'orientation du peptide RWI6 dans des membranes zwitterioniques, nous avons commencé à réaliser des expériences de RMN selon la méthode décrite par Respondek et collaborateurs [197].

Cette expérience, dite PRE (pour « Paramagnetic Relaxation Enhancement »), nécessite l'utilisation d'un agent de relaxation paramagnétique, le Gd(DTPA-BMA), soluble en milieu aqueux et inerte vis-à-vis des membranes et de l'interaction peptide/lipide. Le peptide en fonction de sa structure et de son insertion dans la membrane subit plus ou moins les effets de l'agent relaxant. Ce phénomène se traduit sur les spectres RMN (TOCSY, NOESY) par une diminution de l'intensité des pics de corrélations. Ces variations d'intensités sont quantifiables et directement corrélées à la structure et l'orientation du peptide dans la membrane.

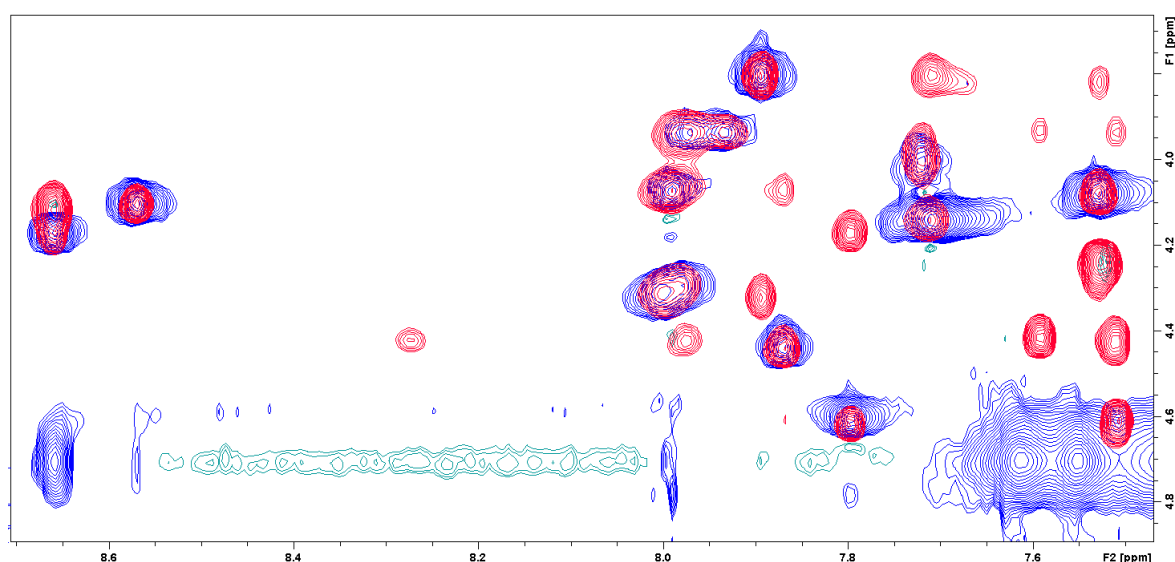
La séquence RMN 2D TOCSY permet d'attribuer chaque système de spin, c'est-à-dire d'attribuer les protons reliés entre eux par couplage scalaire (Figure 47, flèches bleues). La séquence NOESY permet quant à elle de relier entre eux des protons connectés par couplage dipolaire et ayant donc une certaine proximité spatiale (Figure 47, flèches rouges).

L'attribution partielle des protons de la chaîne peptidique a ainsi pu être réalisée pour le peptide RWI6 en présence de micelles de DPC-d<sub>38</sub> à un ratio molaire P/L de 1/50 à 37°C. Toutefois, compte tenu de la symétrie de la séquence de RWI6 et du recouvrement des pics de corrélations, certaines ambiguïtés subsistent encore dans l'attribution.

Ce travail, déjà réalisé pour RW9 [170], est en cours de finalisation et la titration du peptide RWI6 en présence de micelles avec l'agent paramagnétique (Gd(DTPA-BMA)) sera réalisée prochainement.



**Figure 47.** Représentation schématiques de certaines corrélations TOCSY(en bleu) et NOESY (en rouge) attendues pour une structure peptidique.



**Figure 48.** Exemple d'une carte TOCSY (bleu) et NOESY (rouge) superposées, agrandie sur la zone des H $\alpha$  en F1 et des HN des chaînes latérales en F2. Ces spectres correspondent au peptide RWI6 en présence de micelles de DPC à un ratio P/L de 1/50.

## VI. Affinité du peptide pour les membranes

- Résonance Plasmonique aux Ondes guidées (PWR)

La Résonance Plasmonique aux Ondes guidées (PWR) nous permet d'obtenir des informations concernant l'effet du peptide sur l'organisation d'une membrane (anisotropie et épaisseur) et sur son affinité avec les lipides. Les expériences ont été réalisées sur des bicouches supportées composées de lipides purement zwitterioniques (EggPC ou DOPC) ou des bicouches composées de mélanges de lipides anioniques et zwitterioniques (EggPC/POPG 3:1 ou DOPC/DOPS 3:1 mol:mol) en utilisant la méthode décrite par Salamon et collaborateurs [198] et les constantes de dissociation sont présentées Figure 50B.

Les lipides sont déposés sur le prisme puis s'organisent en une bicouche orientée grâce à des lavages de la cellule de PWR avec du tampon. La formation d'une membrane correctement formée est vérifiée par l'analyse des décalages du minimum de résonance pour les résonances  $p$  et  $s$  par rapport au tampon. Lorsque la membrane est formée, des concentrations croissantes de RW16 ont été ajoutées dans le compartiment de la cellule de PWR.

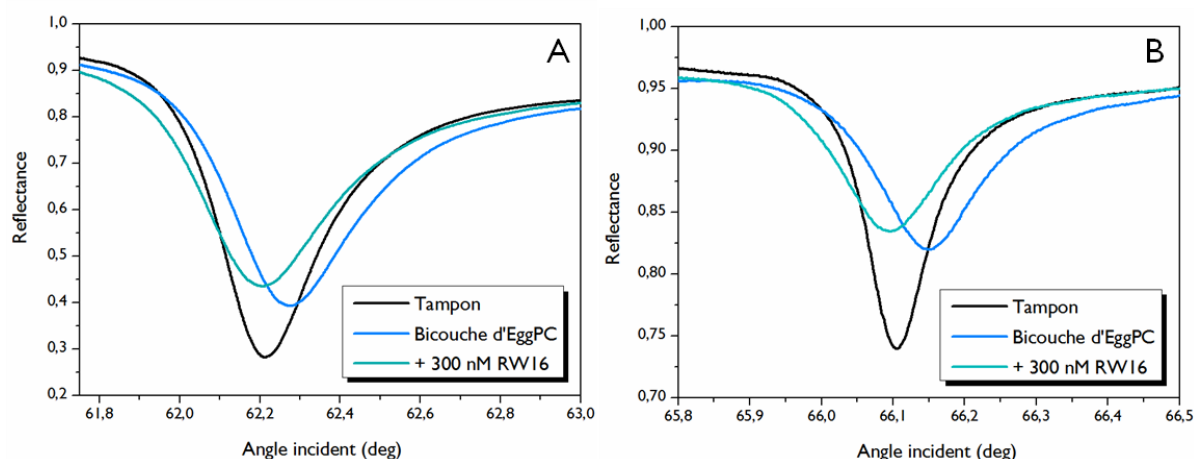
Le signal observé avant et après formation de la bicouche et en présence d'une concentration saturante de peptide pour les polarisations  $p$  et  $s$  sont représentées dans la Figure 49. A partir de ces spectres nous avons pu obtenir des informations relatives au système déposé sur la surface du prisme en analysant le décalage du minimum de résonance en fonction de la concentration de peptide et en ajustant le spectre pour obtenir les paramètres optiques (pour plus de détails, lire [199]). Dans tous les cas, des changements spectraux ont été observés lors de l'ajout de peptide, indiquant une interaction du peptide avec la bicouche. Dans notre cas, lorsque le peptide est ajouté à la bicouche nous avons observé une diminution de masse du système (l'angle de résonance diminue pour chaque polarisation,  $\Delta\alpha < 0$ ) et une diminution de l'épaisseur du système (la profondeur spectrale diminue,  $\Delta R < 0$ ).

Lorsqu'il s'agit d'une simple interaction moléculaire, cela devrait conduire à une augmentation de la position de l'angle de résonance car une augmentation de la masse est produite par l'addition de molécules sur la surface du prisme (augmentation de l'indice de réfraction). Lorsque ce n'est pas le cas, cela signifie que le peptide conduit à la réorganisation de la bicouche résultant en une perte de masse de la membrane.

Deux explications sont possibles pour cela : le peptide a un effet détergent sur la membrane et solubilise une partie de la bicouche, ou le peptide conduit à un changement des propriétés des lipides résultant à une surface occupée par chaque molécule de lipides plus élevée et un rapport masse/surface réduit. Dans ce dernier cas, cela pourrait indiquer la possibilité d'une interdigitation des lipides [200]. A ce stade, il n'est pas possible de distinguer entre ces deux explications mais la perte d'intégrité de la membrane observée par les expériences de fuite de calcéine suggère la formation de pores.

Un spectre typique des changements d'angle de résonance pour la polarisation  $p$  et  $s$  en fonction de concentrations croissantes de RWI6 sur une bicouche d'EggPC est représenté Figure 50A. Ces points peuvent être ajustés grâce à une fonction hyperbolique qui indique qu'une saturation du système se déroule.

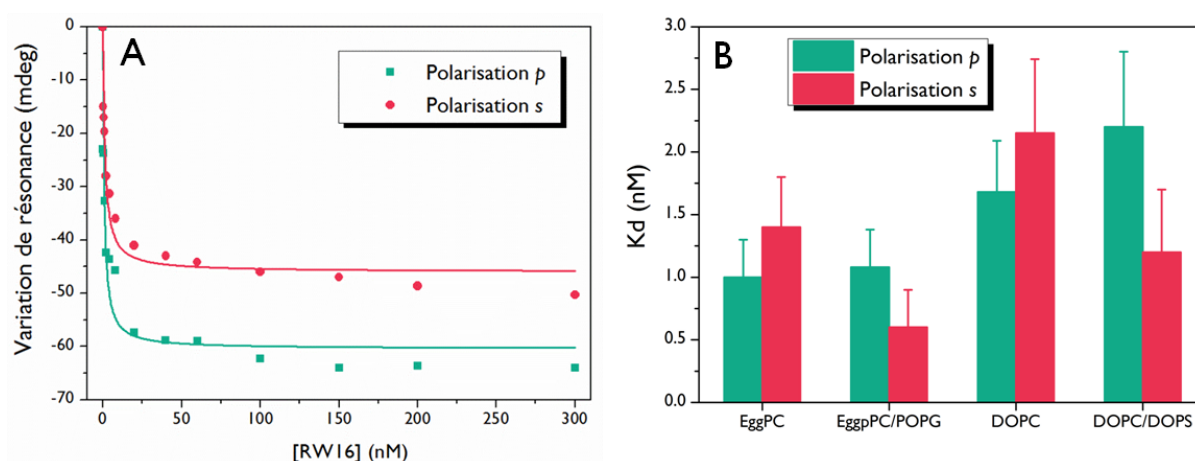
Les constantes de dissociation apparentes sont présentées Figure 50B. L'expérience a été menée sur des bicouches zwitterioniques et anioniques.



**Figure 49.** Interaction de RWI6 avec une bicouche d'eggPC suivie par PWR. A et B correspondent aux spectres de PWR obtenus pour le tampon, la bicouche et la bicouche en présence de 300 nM de RWI6 obtenus pour la polarisation  $p$  et  $s$ , respectivement. L'appareil possède une résolution spectrale angulaire de 1 mdeg.



Dans tous les cas RW16 induit un décalage du minimum de résonance à de plus petits angles, indiquant qu'une réorganisation de la membrane se déroule avec une diminution de la masse du système. En utilisant l'analyse graphique des changements spectraux (voir le Chapitre V, Matériels & méthodes pour plus de détails), la contribution d'un effet de masse ou un effet structural a été calculé, indiquant que des changements de masse étaient de 80-100 % des changements spectraux (100% pour les bicouches d'EggPC et de DOPC et 90 % et 80 % pour les bicouches de DOPC/DOPS et EggPC/POPG respectivement). A notre surprise, les constantes d'affinité obtenues se sont toutes révélées similaires, dans la gamme du nanomolaire, montrant que l'affinité de RW16 n'est principalement pas affectée par la composition lipidique.



**Figure 50. (A)** Décalages du minimum de résonance des polarisations p et s en fonction de la concentration de peptide; **(B)** Constantes de dissociation de RW16 pour différentes bicouches lipidiques déterminées par PWR.

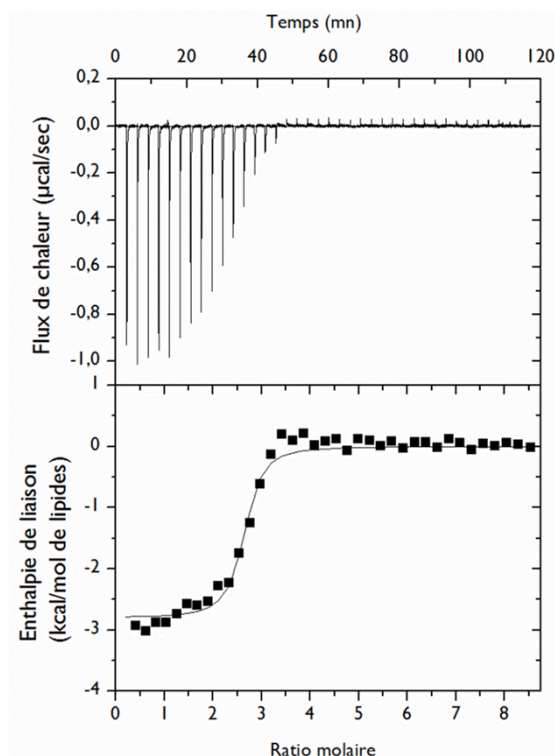
Il est intéressant de noter que ces valeurs rejoignent les valeurs obtenues (50 % du maximum d'activité) avec les expériences de fuite de calcéine. Ainsi les constantes de dissociation reflètent essentiellement la perturbation membranaire exercée par le peptide sur la membrane (formation de pore ou disruption partielle de la membrane) plutôt qu'une simple reconnaissance membranaire telle qu'une interaction électrostatique entre les charges positives des Arg et les charges négatives des phosphates lipidiques ce qui explique le manque de spécificité pour les lipides lors de l'interaction. Enfin, une diminution de l'épaisseur de la bicouche a été observée pour d'autres peptides et cela semble être un mécanisme commun de déstabilisation membranaire par certains peptides membranotropes [201; 202].

- Calorimétrie de Titration Isotherme (ITC)

L'affinité de RW16 pour des LUVs de DOPG et DOPC a été étudiée en utilisant la Calorimétrie de Titration Isotherme (ITC). Cette technique permet une analyse thermodynamique complète de ces interactions ( $\Delta H$ ,  $\Delta S$ ,  $\Delta G$ , stœchiométrie  $n$ ) avec une détermination de la constante de dissociation ( $K_d$ ). Dans ces expériences, la solution de RW16 (0.1 mM) a été titrée avec la solution de LUVs (12.6 mM) et des injections progressives ont été réalisées avec un intervalle de 10 minutes entre chaque injection pour permettre l'équilibration du système.

Lorsque des LUVs de DOPC ont été utilisées aucun signal n'a été observé (aucune injection de peptide n'a nécessité ou produit de chaleur) contrairement aux LUVs de DOPG pour lesquelles un signal exothermique bien défini a été observé (Figure 51).

Dans ce cas, une affinité de l'ordre du micromolaire a été déterminée à partir de ces données expérimentales (Tableau II). Les expériences d'ITC ont été réalisées à plusieurs températures permettant de déterminer la variation de la capacité calorifique,  $\Delta C_p$ , obtenue d'après la pente de la courbe d'ajustement linéaire (Figure 52). Ce paramètre révèle d'importantes informations concernant la nature de l'interaction peptide/lipide.

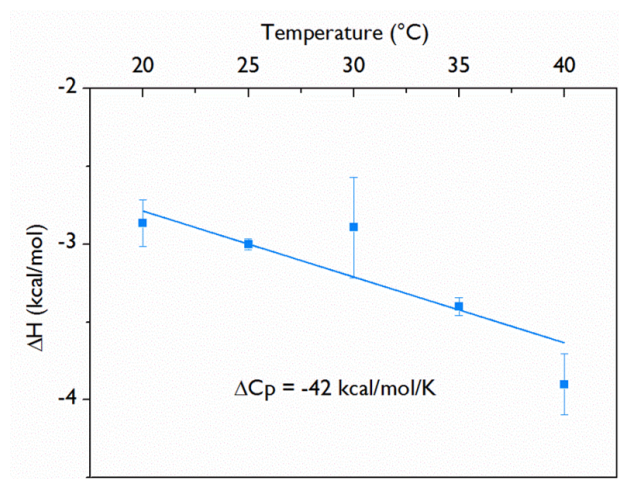


**Figure 51.** Titration de la solution de peptide (0.1 mM) avec des aliquots de 2.5  $\mu$ L de LUVs de DOPG (12.6 mM) (partie supérieure) et le signal intégré correspondant (partie inférieure) pour une température de 20 °C.

La dépendance de température du  $\Delta H$  est représentée dans la Figure 52 et les paramètres thermodynamiques obtenus pour chaque température sont donnés dans le Tableau II. Le  $\Delta C_p$  est la somme de deux éléments qui résultent de la perte d'eau des régions hydrophiles et hydrophobes de la bicouche. Lorsque ce paramètre est supérieur à 0, l'enthalpie est favorable et cela est typique d'interactions électrostatiques.

Lorsque celui-ci est inférieur à 0, l'interaction est guidée par l'entropie, et ceci est typique d'interactions P/L hydrophobes indiquant que la molécule est transférée d'un environnement polaire à un environnement apolaire. Dans notre cas, le  $\Delta C_p$  s'est avéré négatif ( $-42$  kcal/mol/K) indiquant qu'une déshydratation de la région hydrophobe a lieu au cours de l'interaction P/L, et montre que les interactions hydrophobes jouent un rôle important [203]. Ces résultats rejoignent ceux obtenus par PWR qui montrent que l'affinité du peptide n'est pas guidée par les charges des lipides.

Enfin, nous avons observé que la stœchiométrie ( $n$ ) augmente avec la température. Cela peut-être le résultat d'une diminution de l'état d'oligomérisation du peptide qui augmente avec la température (dissociation possible du peptide).



**Figure 52.** Dépendance de température de l'enthalpie de liaison pour l'interaction de RW16 avec le DOPG. Le  $\Delta C_p$  correspond à la pente de la courbe linéaire.

T (°C)	n	Kd (μM)	ΔH (cal/mol)	ΔS (cal/mol/°C)	ΔG (cal/mol)
20	2.32	1.7	-2866	16.6	-3198
25	3.4	1.3	-3004	16.8	-3424
30	3.7	6.7	-2892	14.1	-3315
35	6.8	2.7	-3403	14.4	-3907
40	6.7	18	-3976	9.02	-4337

**Tableau II.** Paramètres thermodynamiques obtenus à partir des expériences d'ITC. La solution de peptide (0.1 mM) a été titrée avec une solution de liposomes de DOPG (12.7 mM). Les expériences ont été réalisées à plusieurs températures.

Un aspect intéressant observé réside dans la différence en termes de comportement du peptide (affinité de liaison, perturbation d'intégrité de la membrane) observée par les différentes techniques. La disparité de ces résultats découle des différentes conditions expérimentales utilisées (liées aux limitations de chaque technique comme la sensibilité par exemple) et plus spécifiquement concernant la concentration du peptide et donc son état d'oligomérisation. Ainsi, les expériences de PWR et de fuite de calcéine ont été effectuées à l'échelle du nanomolaire alors que l'ITC a été réalisé à l'échelle du micromolaire.

Comme le montre les études de DLS, le comportement de RW16 en absence de lipides varie en fonction de sa concentration, avec une auto-association du peptide vers 5 nM. Lors des expériences de PWR et de fuite de calcéine, le peptide est ajouté aux liposomes à partir de concentrations faibles (de l'ordre du picomolaire, le peptide est dans une conformation monomère) tandis que dans les expériences d'ITC les liposomes sont ajoutés au peptide qui se trouve dans une conformation déjà auto-associé (0.1 mM).

A de faibles concentrations, le peptide a ses deux faces (hydrophiles et hydrophobes) exposées pour l'interaction lipidique et peut ainsi interagir avec les lipides zwitterioniques et anioniques avec une affinité supérieure (comme cela a été observé en PWR).

A de plus fortes concentrations, les parties hydrophobes du peptide sont principalement enfouies (auto-association du peptide) et l'interaction P/L est donc principalement hydrophobe avec une affinité plus faible (comme cela a été observé en ITC). Ceci explique pourquoi aucun signal n'a été observé en présence de LUVs de DOPC en ITC, alors qu'une interaction a été observée en PWR.

Ces disparités de comportement du peptide en présence de différents types de lipides et en fonction de sa concentration sont plus amplement détaillées dans la conclusion ci-dessous.

## VII. Conclusions

Dans ce chapitre, nous avons étudié l'interaction d'un CPP ayant des propriétés antibactériennes et anti-tumorales, RWI6, en présence de différents systèmes lipidiques modèles afin de mieux comprendre son mode d'action.

Comme cela a été mentionné précédemment, RWI6 possède la capacité de s'auto-associer, ce qui change et complique l'analyse des résultats. Un équilibre entre les formes monomères et oligomères existe. Des concentrations faibles ( $< 5$  nM) favorisent la forme monomérique, et de fortes concentrations ( $> 5$  nM) favorisent la forme oligomérique. L'auto-association du peptide conduit à une structure hélicoïdale et cet état modifie de manière drastique son interaction avec les lipides. En effet, à l'état monomère le peptide peut avoir les parties hydrophiles et hydrophobes exposées au solvant et donc disponibles pour l'interaction avec les lipides. A l'état oligomère, le peptide va principalement présenter sa face hydrophile puisque la face hydrophobe sera en grande partie enfouie dans le cœur hydrophobe de l'oligomère. L'idéal, afin de bien comprendre le système, serait de réaliser une caractérisation complète de l'interaction du peptide sous ces deux formes (monomère et oligomère) avec la membrane. Cependant, cela n'est pas possible en raison des limites de sensibilité ou autres limitations de chaque technique employée.

Nous avons constaté que la disparité des résultats d'affinité P/L mesurée par PWR et ITC doivent résulter des différences de concentration et donc de l'état du peptide dans les deux expériences. Ainsi, lorsqu'à des concentrations de l'ordre du nM, le peptide reste à l'état monomère et se lie aux membranes anioniques avec une forte affinité ( $K_d \sim 2$  nM, données de PWR), à des concentrations de l'ordre du  $\mu$ M, le peptide se trouve dans un état auto-associé et se lie avec une plus faible affinité à la bicouche (de l'ordre du  $\mu$ M, données d'ITC) (Figure 53, étape I, partie gauche).

La liaison du peptide aux lipides anioniques se déroule d'abord principalement via des interactions électrostatiques grâce aux charges positives du peptide. Cela entraîne une exposition non-favorable de la partie hydrophobe du peptide. Pour contrecarrer cet effet, le peptide "flip" grâce aux Arg qui agissent comme une charnière et insère ses Trp dans la membrane pour protéger la partie hydrophobe du solvant. L'auto-association du peptide conduit alors à une agrégation des liposomes (Figure 53, étape II et III, partie gauche). L'agrégation des liposomes peut aussi résulter d'une neutralisation des charges de surface par la liaison du peptide, qui diminue la répulsion électrostatique.

La liaison du peptide aux lipides anioniques est accompagnée d'un changement de conformation à une structure en feuillet  $\beta$ . En présence de lipides zwitterioniques, aucune enthalpie de liaison n'a été observée par ITC car le peptide se trouve à des concentrations supérieures à 5 nM et se trouve donc en conformation oligomère, tandis qu'en PVR une interaction a été observée car le peptide se trouve en forme monomère (Figure 53, étape I, partie droite).

A des concentrations croissantes de peptide, de fortes répulsions entre les oligomères en solution doivent conduire à une rupture partielle de ces oligomères et à l'insertion du peptide dans la membrane, la partie hydrophobe enfouie dans la bicouche sous les glycérols des phospholipides (Figure 53, étape II, partie droite). Dans ce cas le peptide reste structuré en hélice  $\alpha$ . Les expériences démontrent que les interactions électrostatiques sont importantes pour l'interaction du peptide avec la membrane. Des interactions et des perturbations plus fortes des lipides anioniques sont observées contrairement aux lipides zwitterioniques. Cela découle de façon logique après ce qui a été montré précédemment concernant les CPPs cationiques. Le fait que l'interaction P/L semble principalement guidée par des interactions hydrophobes plutôt qu'électrostatiques est cependant plus surprenant. Si les interactions électrostatiques entre les Arg et les têtes polaires des lipides sont importantes pour un premier contact membranaire (Figure 53, étape I), les contacts hydrophobes, probablement entre les résidus Trp et la région des acides gras lipidiques, deviennent importants dans un second temps (Figure 53, étape II).

Un équilibre s'établit entre peptide inséré et non-inséré, ce qui conduit, dans le cas du peptide non-inséré, à son oligomérisation pour protéger les faces hydrophobes du solvant (Figure 53, étape III, partie gauche). En effet, les études calorimétriques démontrent l'importance des interactions hydrophobes et les études de fluorescence suggèrent que pour chaque type de lipides les résidus Trp voient leur environnement modifié pour un environnement plus hydrophobe, donc inséré dans la région des acides gras.

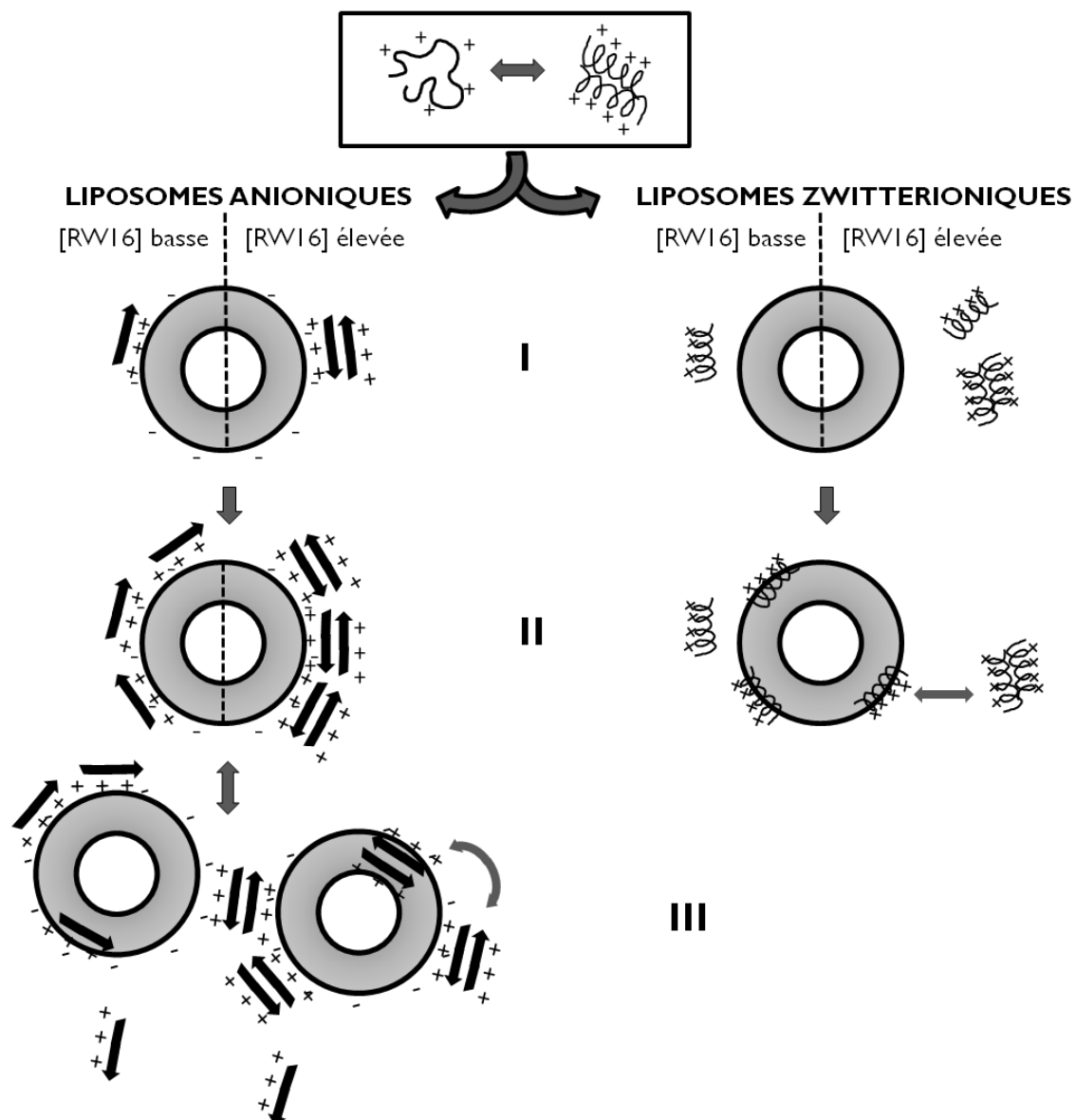
Une insertion plus profonde dans les membranes zwitterioniques est suggérée par les études de DSC, résultant probablement du fait que dans les lipides anioniques le peptide peut être retenu à la surface à cause d'interactions électrostatiques avec les têtes polaires (Figure 53, étape I, parties gauche et droite). L'accumulation de peptide dans la membrane, soit à l'état monomérique ou oligomérique, crée un déséquilibre dans la membrane qui peut conduire à la formation de pores transitoires ou de perturbation de la membrane permettant le passage du peptide. Cette étape, dans le cas des lipides anioniques, est accompagnée d'une perturbation plus forte de la membrane avec une agrégation des liposomes (Figure 53, étape III, partie gauche) ainsi que la formation de différents types de structures supramoléculaires (observé par la Cryo-TEM).

En plus d'une interaction préférentielle avec les lipides anioniques, RWI6 aurait la capacité de recruter ces lipides à partir de mélanges de lipides comme cela est montré par les expériences de DSC. Cela est intéressant quand on considère que les membranes cellulaires réelles, par exemple celles des cellules cancéreuses, contiennent une petite quantité de lipides anioniques. Lorsqu'ils sont rassemblés en domaines, ces composants lipidiques mineurs pourraient présenter un potentiel intéressant. Les interactions et perturbations favorisées qui sont observées en présence de RWI6 avec les lipides anioniques sont importantes considérant le potentiel rapporté de ce peptide en ce qui concerne la perturbation sélective de la mobilité et de l'activité de remodelage de l'actine dans des cellules tumorales [167]. Ainsi, il serait intéressant de réaliser des simulations de dynamique moléculaire en présence de membranes lipidiques composées entièrement de lipides anioniques ou même d'un mélange de lipides contenant un faible pourcentage de lipides anioniques.



Les membranes des cellules cancéreuses sont plus anioniques que celles des cellules saines en raison de lipides anioniques présents sur leur feuillet membranaire externe (PS principalement) et de la surexpression de certains protéoglycanes porteurs de charges négatives. De tels effets accrus de RW16 sur des membranes anioniques pourraient expliquer son potentiel en tant qu'agent anticancéreux. En effet, de récentes études soulignent aussi la sélectivité de certains CPPs pour les cellules cancéreuses et les tumeurs [139-141].

Une partie de ce travail a fait l'objet d'une publication : Jobin ML, Bonnafe P, Temsamani H, Dole F, Grelard A, Dufourc EJ, Alves ID, The enhanced membrane interaction and perturbation of a cell penetrating peptide in the presence of anionic lipids: toward an understanding of its selectivity for cancer cells, *Biochim Biophys Acta* (**2013**), 1828: 1457-1470.



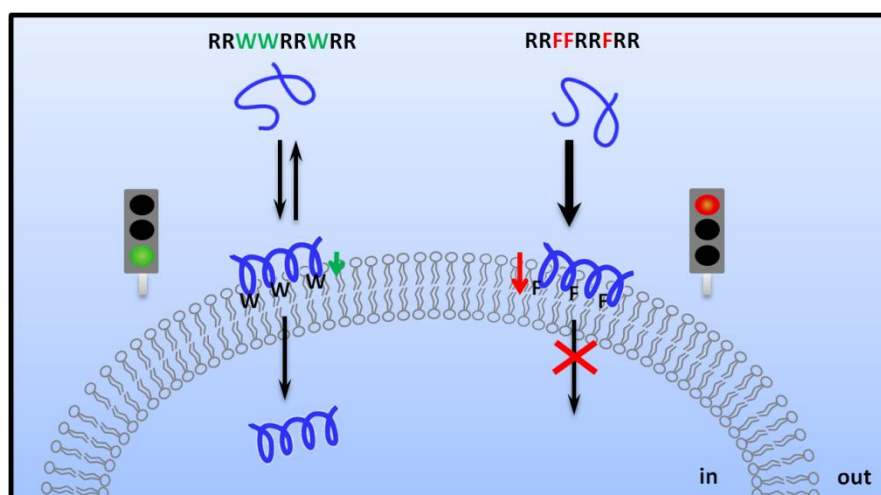
**Figure 53.** Schéma récapitulatif du mode d'interaction P/L de RWI6 avec des liposomes anioniques et zwitterioniques et à des concentrations en peptide basses (inférieures à 5nM) ou hautes (supérieures à 5nM). Le peptide est représenté en monomères de feuillet  $\beta$  ou d'hélices  $\alpha$  à de faibles concentrations et en oligomères de feuillets  $\beta$  ou d'hélices  $\alpha$  à de fortes concentrations.





# CHAPITRE IV

## INTERNALISATION CELLULAIRE ET INTERACTION MEMBRANAIRE DE RW9 ET DE SES DERIVES RX9





## I. RW9 et ses analogues RX9

Des études sur la pénétratine ont montré que le remplacement des Trp<sup>48</sup> et Trp<sup>56</sup> par des Phe abolit son internalisation [204]. A partir de ces études, le CPP riche en Arg, RW9, a été synthétisé par Chassaing et collaborateurs et a montré une internalisation très efficace dans des cellules eucaryotes [166]. Des études biophysiques ont également montré une interaction préférentielle avec des modèles membranaires anioniques corroborant les études biologiques sur l'importance des interactions électrostatiques entre peptides et membranes. Des études précédentes sur RL9 (RRLLRRLRR), un analogue de RW9 dans lequel les résidus Trp sont remplacés par des Leu ont montré que ce peptide perd ses propriétés d'internalisation cellulaire malgré le fait qu'il s'accumule toujours à la membrane [97]. D'un autre côté, l'oligoarginine R9 ne possède aucun résidu aromatique mais s'internalise très bien dans des cellules eucaryotes avec une efficacité équivalente à celle de RW9.

Ainsi, le rôle des Trp dans l'internalisation des CPPs riches en arginine n'est pas clair pour le moment. L'objectif principal est donc de comprendre le rôle des Trp lors de la translocation membranaire dans la séquence de RW9. Pour cela nous avons synthétisé 7 peptides dérivés de RW9 dans lesquels nous avons systématiquement remplacé les Trp par des Phe (RX9) (Tableau 12 et Figure 54).

	Séquences en AA des peptides	MW (Da)	Charges (à pH 7)
<b>RW9</b>	Biotine(O <sub>2</sub> )-G <sub>4</sub> -RRWRRRWR - NH <sub>2</sub>	1999	6
<b>RFFF9</b>	Biotine(O <sub>2</sub> )-G <sub>4</sub> -RRFFRRFR - NH <sub>2</sub>	1882	6
<b>RFFW9</b>	Biotine(O <sub>2</sub> )-G <sub>4</sub> -RRFFRRWR - NH <sub>2</sub>	1921	6
<b>RWFF9</b>	Biotine(O <sub>2</sub> )-G <sub>4</sub> -RRWFRRFR - NH <sub>2</sub>	1921	6
<b>RFWF9</b>	Biotine(O <sub>2</sub> )-G <sub>4</sub> -RRFWRRFR - NH <sub>2</sub>	1921	6
<b>RFWW9</b>	Biotine(O <sub>2</sub> )-G <sub>4</sub> -RRFWRRWR - NH <sub>2</sub>	1960	6
<b>RWWF9</b>	Biotine(O <sub>2</sub> )-G <sub>4</sub> -RRWRRFR - NH <sub>2</sub>	1960	6
<b>RWFW9</b>	Biotine(O <sub>2</sub> )-G <sub>4</sub> -RRWFRRWR - NH <sub>2</sub>	1960	6

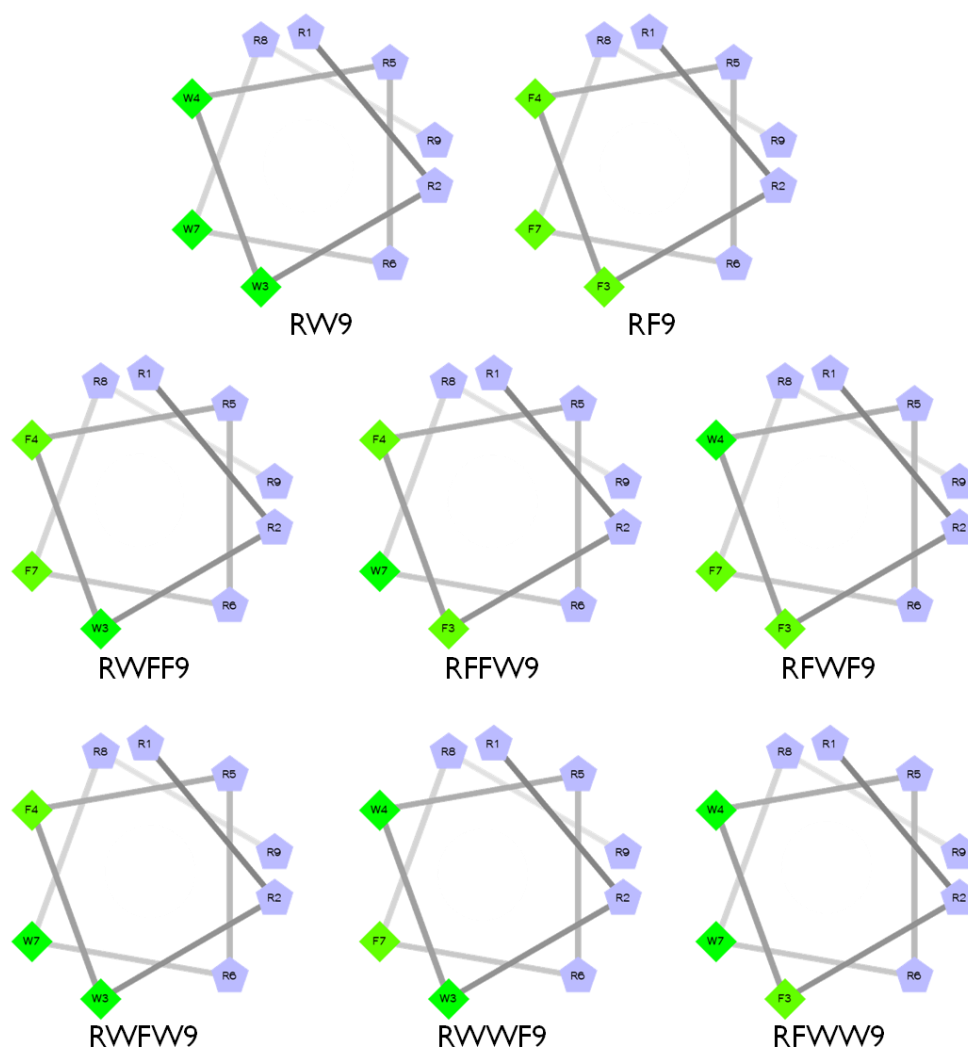
**Tableau 12.** Séquences d'acides aminés de RW9 et de ses dérivés RX9, leur masse molaire et leur charge nette à pH 7.

L'idée est de préserver l'hydrophobicité et plus spécifiquement l'aromaticité des résidus hydrophobes. En effet, des études RMN précédentes sur RW9 ont mis en évidence l'existence d'interactions  $\pi$ -cations entre certains résidus Arg et Trp ce qui permettrait de masquer partiellement les charges des Arg et faciliter le passage du CPP à travers la membrane [97].

La cytotoxicité des analogues RX9 a été étudiée sur des cellules eucaryotes. La quantification de l'internalisation cellulaire de ces peptides a été aussi étudiée. Des études biophysiques ont ensuite été réalisées sur des membranes modèles afin de mieux comprendre la relation entre l'internalisation cellulaire et l'interaction des CPPs avec les membranes.

Comme cela a été mentionné auparavant, RW9 est internalisé par les deux voies principales, l'endocytose étant la plus utilisée (à 80%) et la voie de translocation directe (à 20%) [97]. Nous avons décidé de focaliser nos études sur la compréhension des mécanismes d'internalisation des peptides par translocation directe et nous nous sommes donc focalisés sur l'étude de l'interaction peptide/lipide. Pour cela des études biophysiques ont été réalisées sur des modèles membranaires composés de lipides zwitterioniques et anioniques dans le but de mimer les membranes cellulaires eucaryotes. Même si les lipides anioniques sont peu présents à la surface des membranes cellulaires (~2 %), le peu de lipides anioniques peut se concentrer en domaines dans la membrane, une propriété rapportée pour être induite par certains CPPs [159]. De plus, lors de certains processus cellulaires (angiogenèse et apoptose), le feuillet externe de la membrane devient d'avantage anionique dû au passage de PS du feuillet interne au feuillet externe. Les lipides anioniques miment aussi le caractère anionique de la membrane cellulaire en raison de la présence de sucres membranaires (HSPGs). Enfin, des études biologiques sur RW9 ont aussi révélé une diminution importante de son internalisation dans des cellules déficientes en GAG montrant que les protéoglycanes de la surface de la membrane cellulaire sont importants pour son internalisation cellulaire [97].





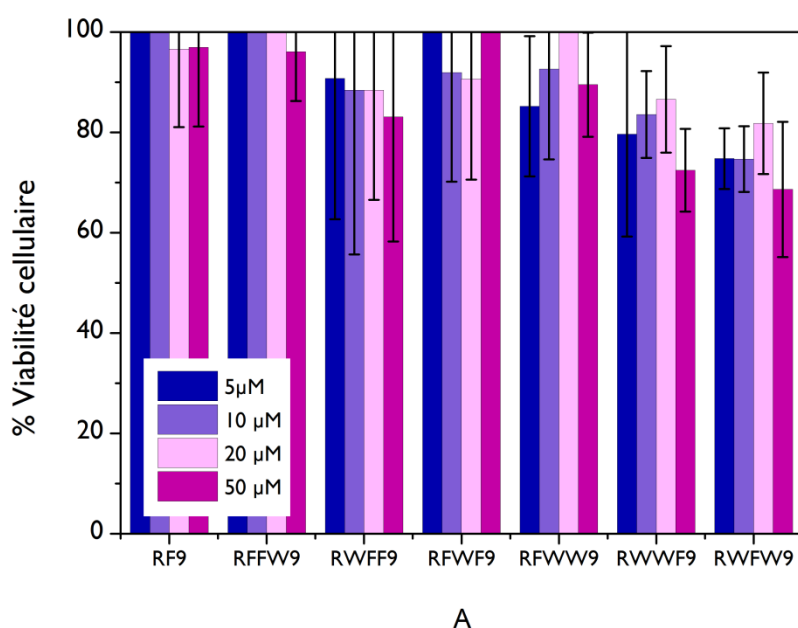
**Figure 54.** Représentation en roue hélicoïdale de RW9 et de ses dérivés RX9. Les acides aminés hydrophobes sont représentés en losange et les résidus chargés positivement en pentagone. Le degré d'hydrophobicité est représenté en vert avec l'hydrophobicité diminuant vers le jaune. Les projections ont été générées sur <http://r2lab.ucr.edu/scripts/wheel/wheel.cgi>.

## II. Cytotoxicité des dérivés RX9

La viabilité cellulaire de cellules CHO-K1 a été vérifiée en présence des analogues RX9 afin d'observer si le remplacement des Trp par des Phe entraîne une cytotoxicité des CPPs. En effet, une des qualités essentielles d'un bon peptide vecteur relève de son absence de toxicité envers les cellules.

La viabilité cellulaire a été mesurée sur des cellules CHO-K1 grâce au test CCK8 permettant d'obtenir le taux de cellules viables suite à leur incubation avec les peptides. Les concentrations de peptides utilisées sont de 5  $\mu$ M jusqu'à 50  $\mu$ M et l'incubation des peptides avec les cellules a été réalisée pendant 1h30 à 37°C.

Aucun des peptides ne présentent de cytotoxicité significative à ces concentrations (Figure 55). Cela démontre que le remplacement des résidus Trp par des résidus Phe dans la séquence n'affecte pas la cytotoxicité des peptides.



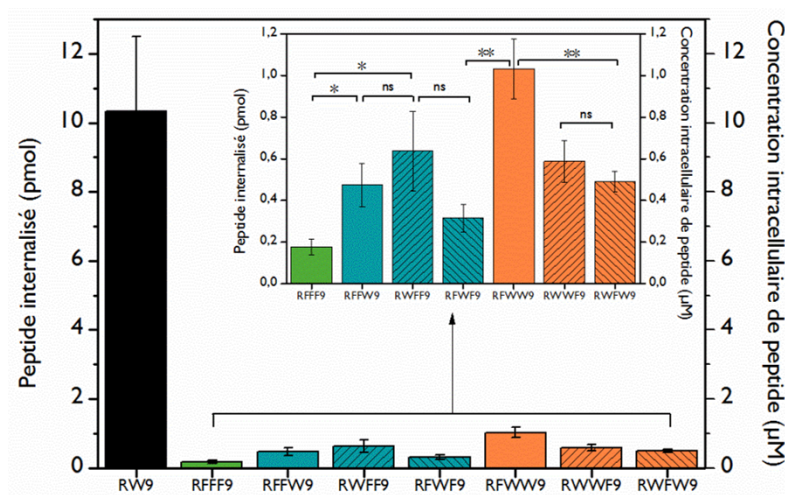
**Figure 55.** Viabilité cellulaire en présence des analogues RX9 sur des cellules CHO-K1 après incubation pendant 1h à 37°C. Les peptides ont été incubés à des concentrations croissantes de 5, 10, 20 et 50  $\mu$ M.

### **III. Internalisation cellulaire et accumulation des peptides RX9 à la membrane**

La quantification de l'internalisation cellulaire de chaque peptide a été étudiée grâce au protocole décrit par Burlina et collaborateurs qui utilise la spectrométrie de masse comme méthode analytique [129]. Les expériences ont été réalisées sur des cellules CHO-K1 à 37°C (Figure 56).

A cette température, différentes voies d'internalisation peuvent être empruntées par les peptides (endocytose et translocation directe), tandis qu'à basse température (4 °C), l'endocytose est bloquée et la translocation directe est la voie principale utilisée par les CPPs [205; 206]. Nous n'avons pas pu réaliser les expériences à 4°C avec les analogues RX9. En effet, comme cela sera montré plus bas, la quantité de peptide internalisé est déjà très basse à 37°C. A 4°C, du fait de l'inhibition de l'endocytose (voie principale empruntée par ces peptides), l'internalisation serait très certainement inférieure, comme cela a été observé pour RW9 [97] et la comparaison entre les RX9 deviendrait impossible.

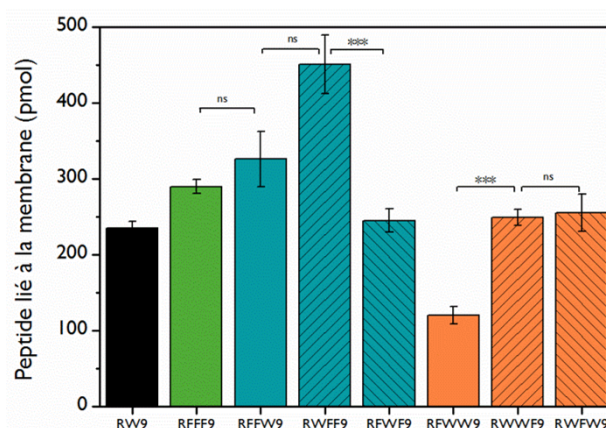
Les résultats montrent que tous les RX9 sont moins internalisés (~ 1 pmole) que RW9 (~ 10 pmoles), avec une diminution de 10 fois le taux d'internalisation (Figure 56). L'internalisation la plus faible (~ 0.2 pmoles) est observée pour le dérivé ne contenant aucun résidu Trp (RF9). Les analogues contenant 1 ou 2 Trp sont légèrement plus internalisés (~ 1 pmole) que RF9 mais montrent peu de différences entre eux. Ces résultats montrent ainsi que la présence des résidus Trp est importante pour l'internalisation des peptides.



**Figure 56.** Quantification de peptide internalisé dans des cellules CHO-K1 et concentration intracellulaire de peptide par la méthode de Burlina et collaborateurs [129]. La significativité a été testée par un test de Student : ns :  $p > 0,05$  ; \*  $0,01 < p < 0,05$  ; \*\*  $0,01 < p < 0,001$ .

Le premier contact entre un peptide et une cellule se trouve au niveau de la membrane plasmique et la quantification de peptide lié à la membrane des cellules a été réalisée grâce au protocole développé par Burlina et collaborateurs [129].

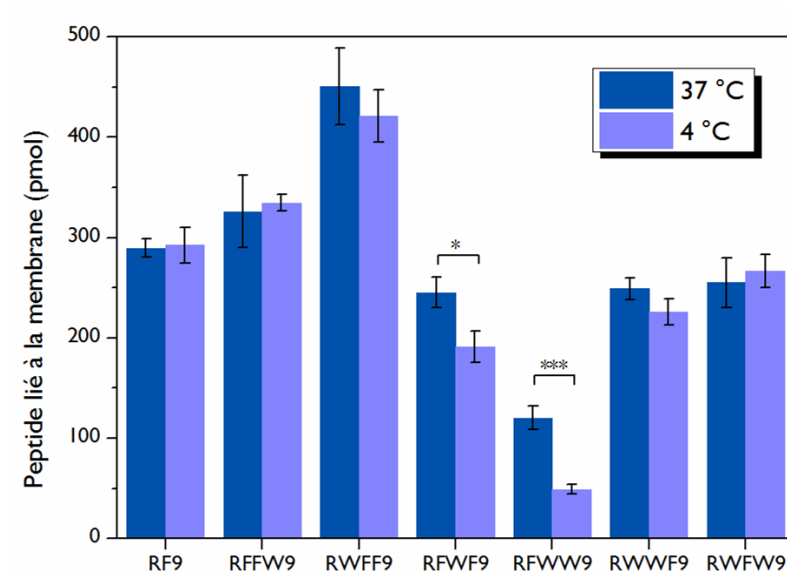
Ces expériences montrent que les RX9 s'accumulent à la membrane avec le même ordre de grandeur que RW9 (~ 250 pmoles) (Figure 57). L'analyse de peptide lié à la membrane réalisée à 4°C montre que les résultats sont similaires aux résultats obtenus à 37°C (Figure 58).



**Figure 57.** Quantification du peptide lié à la membrane par la technique de Burlina et collaborateurs [129]. La significativité a été testée par un test de Student : ns :  $p > 0,05$  ; \*  $0,01 < p < 0,05$  ; \*\*  $0,01 < p < 0,001$  ; \*\*\*  $p < 0,005$ .

En terme de comportements extrêmes, le peptide RWWF9 s'accumule le plus à la membrane (~ 450 pmoles), tandis que le peptide RFWW9 s'accumule le moins (~ 100 pmoles). Ces résultats montrent que la présence de Trp est importante pour l'internalisation cellulaire des RX9. Cependant, aucune corrélation n'existe entre la quantité de peptide lié à la membrane et la quantité de peptide internalisé dans la série des peptides RX9.

A partir des résultats d'internalisation cellulaire, nous avons sélectionné les 5 peptides qui paraissaient être les plus représentatifs de la série de RX9 pour réaliser des études biophysiques, et notamment des peptides avec un nombre de résidus Trp variable et avec des différences d'internalisation significatives. Nous avons donc choisi de travailler avec le peptide sans résidus Trp (RF9), 2 peptides contenant 1 Trp (RFFWF9 et RWWF9) et 2 peptides avec 2 Trp (RFFWW9 et RWWF9). Des expériences biophysiques ont été réalisées sur ces 5 peptides sélectionnés afin de caractériser leur interaction avec des membranes lipidiques et dans le but de corrélérer ces informations avec les différences observées dans l'efficacité d'internalisation. Pour certaines expériences, les données n'étant pas disponibles dans la littérature, nous avons aussi réalisé les expériences avec le peptide RW9.



**Figure 58.** Comparaison de la quantification des analogues RX9 liés à la membrane à 37 °C et à 4 °C sur des cellules CHO-K1 par la technique de Burlina et collaborateurs [129]. La significativité a été testée par un test de Student : ns :  $p > 0,05$  ; \*  $0,01 < p < 0,05$  ; \*\*\*  $p < 0,005$ .

## IV. Interaction peptide/lipide des RX9

### IV. 1. Effet des RX9 sur la taille et l'intégrité des liposomes

- Diffusion dynamique de la lumière (DLS)

Des expériences de DLS ont été réalisées afin d'observer l'influence des peptides sur la taille des liposomes et leur distribution de taille. Les mesures ont été réalisées sur des liposomes unilamellaires larges (LUVs) de DOPC, DOPG et DOPC/DOPG (4 :1) en absence et en présence de peptide à différents ratios P/L.

	<b>DOPC</b>	<b>DOPG</b>	<b>DOPC/DOPG (4:1)</b>
<b>RF9</b>	1.4 ± 0.4	21 ± 2	20 ± 1
<b>RWFF9</b>	11 ± 1	20 ± 2	48 ± 0.2 *
<b>RFWF9</b>	1.4 ± 1	23 ± 3	55 ± 1 *
<b>RFWW9</b>	6 ± 2	39 ± 2	130 ± 31 *
<b>RWWF9</b>	12 ± 1	22 ± 2	50 ± 3 *

**Tableau 13.** Variation de distribution de taille de liposomes de DOPC, DOPG et de DOPC/DOPG en présence de ratios P/L 1/50 de peptide. \* signifie que l'indice de polydispersité (pdi) est supérieur à 0.3

Le Tableau 13 présente les variations de taille des liposomes en présence des RX9 obtenues à partir des expériences de DLS. Dans certains cas, nous avons observé un indice de polydispersité (pdi) supérieur à 0.3. Le pdi nous informe sur l'homogénéité des rayons hydrodynamiques des objets présents dans la solution. Lorsque celui-ci est supérieur à 0.3 cela indique que la solution est hétérogène et plusieurs populations d'objets de différents rayons hydrodynamiques sont présentes dans la solution. Cela nous empêche d'être précis sur le rayon hydrodynamique des liposomes et de déterminer leur taille avec exactitude.

Dans le cas du DOPC, la taille des liposomes (LUVs extrudés avec un filtre de 100 nm) n'est pas modifiée de façon significative par l'ajout de peptide.

Dans le cas de liposomes anioniques (DOPG ou DOPC/DOPG), la taille et la polydispersité des liposomes ont augmenté de manière significative (jusqu'à une augmentation du rayon hydrodynamique de 100 nm de plus par rapport aux LUVs seules). Cela montre qu'il y a un phénomène d'agrégation ou de fusion des liposomes lorsque le peptide est ajouté à ces liposomes. La même observation a été rapportée par Walrant et collaborateurs sur l'effet de RV9 sur des liposomes anioniques en suivant les changements de turbidité [97].

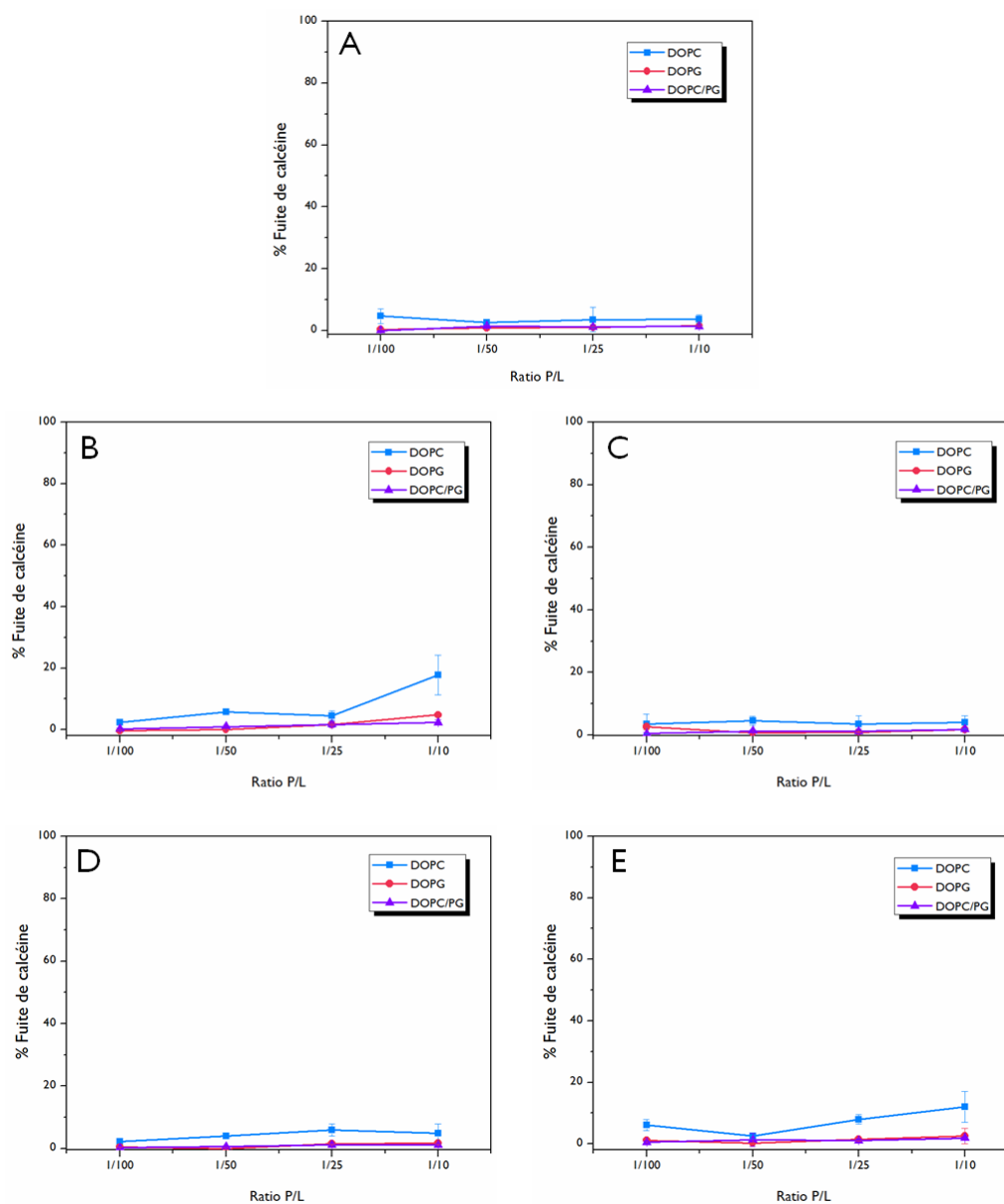
Aucune différence significative n'a été observée entre les différents analogues indiquant que l'interaction peptide/lipide pourrait être principalement conduite par des forces électrostatiques et donc par le nombre d'Arg qui est le même pour tous les peptides.

- Fuite de calcéine

Des expériences de fuite de calcéine ont été réalisées pour comprendre si les RX9 perturbent l'intégrité membranaire des liposomes de différentes compositions (comme la formation de pores, etc.).

Dans le cas des liposomes anioniques, aucune fuite de calcéine n'a été mesurée (inférieure à 1%) après 1h d'incubation des peptides (Figure 59). Cela signifie que l'intégrité membranaire des liposomes anioniques n'est pas affectée par l'ajout des RX9.

Dans le cas des liposomes zwitterioniques, la fuite de calcéine est légèrement plus élevée (mais inférieure à 5 %) indiquant que les RX9 perturbent légèrement ce type de liposomes. Nous avons observé que la fuite de calcéine est similaire pour tous les analogues RX9 et à tous les ratios P/L (1/100 à 1/10). Cela peut résulter d'une saturation et d'une rigidification de la surface de la bicouche par les peptides, induisant une légère fuite de calcéine. Ces résultats montrent que les peptides ne perturbent pas de façon significative l'intégrité membranaire (pas de formation de pores) et sont en accord avec les résultats de cytotoxicité.



**Figure 59.** Pourcentages de fuite de calceïne des LUVs composées de DOPC, DOPG et DOPC/DOPG (4:1 mol/mol) induite par les analogues RX9 à différents P/L ratios. **(A)** RF9 **(B)** RWFF9 **(C)** RWF9 **(D)** RWW9 **(E)** RWWF9.



## V. Effet des membranes sur les RX9

- Dichroïsme circulaire (CD)

La structure secondaire des RX9 a été étudiée par dichroïsme circulaire (CD) en absence et en présence de LUVs de différentes compositions et les spectres CD sont représentés dans la Figure 60.

Comme pour RW9, les spectres CD des RX9 sont fortement affectés par les interactions  $\pi$ - $\pi$  des résidus aromatiques [97].

Dans le cas de RF9, RFWW9 et RWWF9 (3 Phe et 1 Phe respectivement), une bande négative vers 230 nm a été observée et empêche une déconvolution spectrale correcte. Cette bande est négative dans le cas de RWWF9 et positive dans le cas de RFWF9. Cela dépend de l'orientation des résidus aromatiques dans la structure secondaire du peptide [172-174].

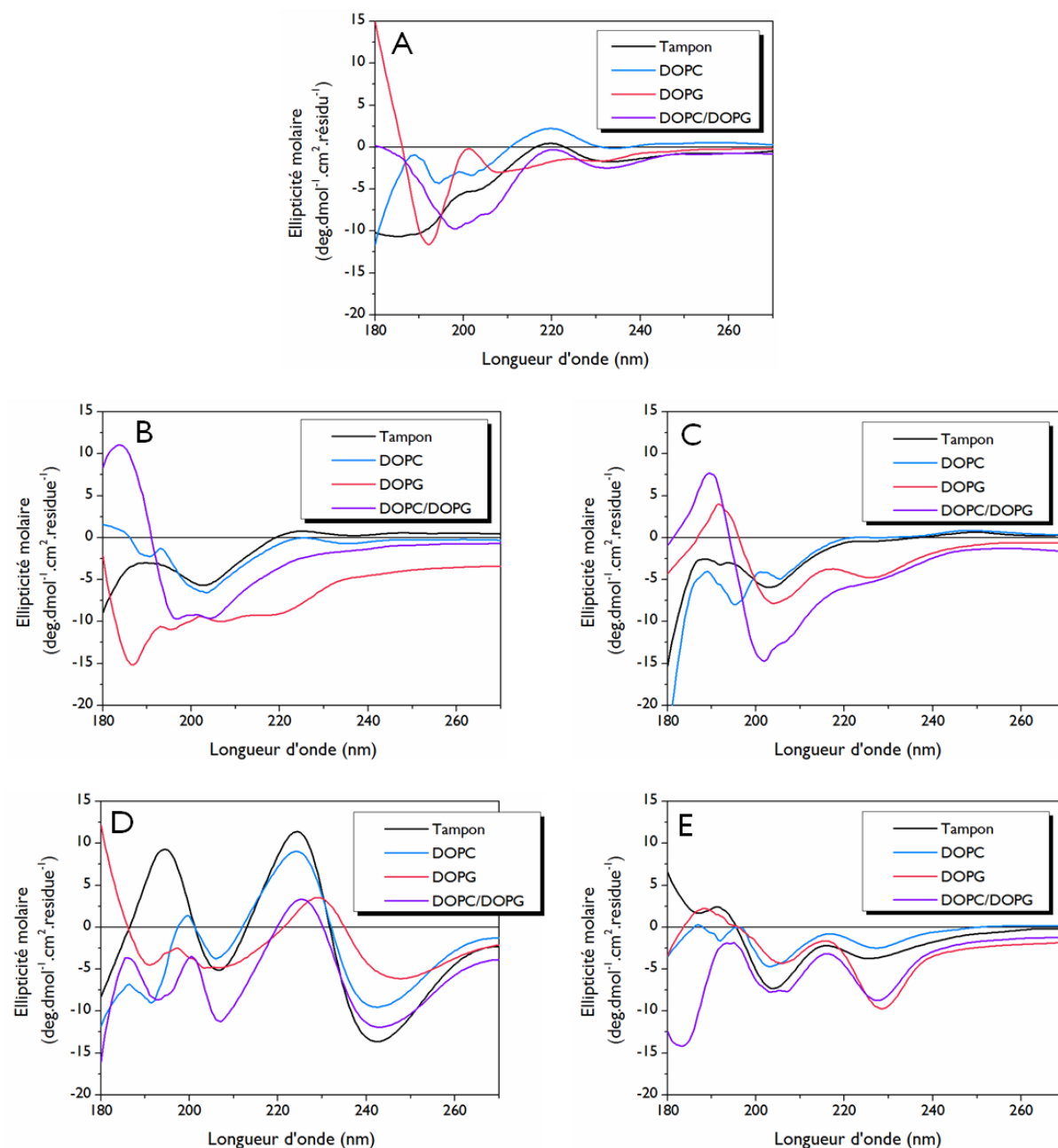
Les peptides avec 2 Phe (RFWF9 et RWFF9) ont donné des résultats plus interprétables car aucune absorbance n'a été observée à 230 nm. Cela a permis de décomposer ces spectres CD et de déterminer un pourcentage de structure secondaire.

En solution et en présence de lipides zwitterioniques, les peptides adoptent une structure majoritaire en pelote statistique avec une faible proportion d'hélice  $\alpha$  (~10 %). En présence de lipides anioniques, 2 bandes négatives à 208 et 222 nm ont été observées indiquant une structuration des peptides en hélice  $\alpha$  (20%). Une structuration en hélice  $\alpha$  en présence de lipides anioniques a aussi été observée dans le cas de RW9 [97]. De plus, une interaction  $\pi$ -cation préférentielle entre les résidus Arg<sup>8</sup> et Trp<sup>4</sup> et Trp<sup>7</sup> a été mise en évidence par RMN en solution par Walrant et collaborateurs [97]. Pour certains analogues RX9 nous avons remplacé le Trp<sup>4</sup> et Trp<sup>7</sup> par des Phe donc ces interactions peuvent avoir été perturbées. Par exemple, le peptide le plus internalisé dans la série des RX9 est RFWW9, qui garde les Trp<sup>4</sup> et Trp<sup>7</sup> et préserve ainsi ces interactions. Les interactions  $\pi$ -cations semblent donc affecter l'efficacité d'internalisation des peptides. Cela n'est pas surprenant sachant que de telles interactions permettent de masquer les charges positives du peptide et induisent une translocation de la membrane moins « coûteuse » énergétiquement qui serait sinon plutôt défavorable.

La possibilité d'une corrélation entre la capacité d'un CPP à adopter une structure secondaire particulière et traverser les membranes n'est pas claire dans la littérature. Par exemple, dans le cas de la pénétratine, il a été montré qu'une structure secondaire en hélice  $\alpha$  n'est pas nécessaire pour son internalisation [63; 207]. Nos résultats indiquent que le remplacement des Trp par des Phe ne change pas la structure secondaire des RX9 en interaction avec les lipides et donc la structure secondaire en contact avec les lipides n'est pas corrélée directement avec leur internalisation cellulaire.

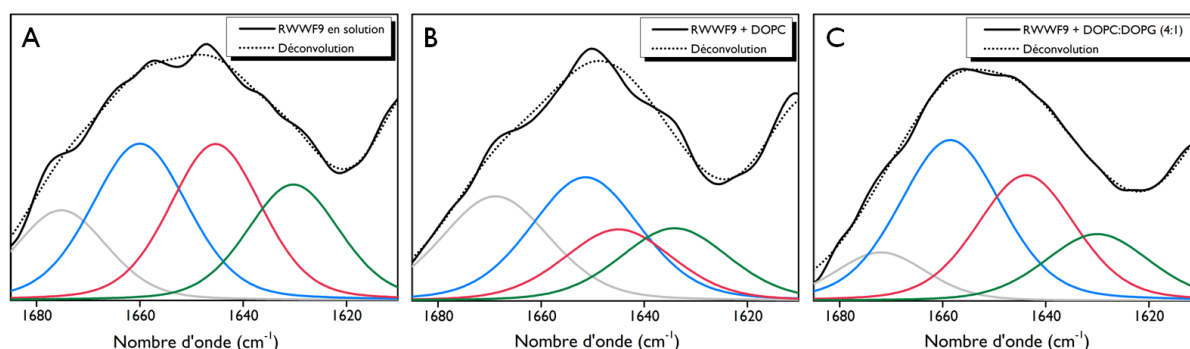
- Infrarouge à transformée de Fourier en Réflexion Totale Atténuée (FTIR-ATR)

La structure secondaire des peptides en présence de lipides a été étudiée par FTIR-ATR pour contourner le problème des bandes spectrales causées par les résidus Trp et permettre une détermination plus précise de la structure secondaire des peptides. Cependant, nous avons observé que les peptides sont principalement non structurés et cela correspond à un mélange de peptides qui adoptent des structures secondaires différentes (Figure 61).



**Figure 60.** Spectres CD des analogues RX9 en absence (tampon phosphate 10 mM pH 7.4) ou en présence de liposomes au ratio P/L 1/25. **(A)** RFFF9, **(B)** RWFF9, **(C)** RFWF9, **(D)** RFWW9 et **(E)** RWWF9. La concentration de lipides est de 1 mg/mL et la concentration de peptide est de 50  $\mu\text{M}$ .

Nous n'avons donc pas été en mesure de réaliser une décomposition spectrale et de déterminer avec certitude le type et la proportion de structure secondaire de chaque peptide. Cependant, nous avons pu observer une augmentation de la proportion d'hélice  $\alpha$  (bande d'absorption à  $1656\text{ cm}^{-1}$ ) pour certains peptides en présence de lipides anioniques (Figure 61 et Tableau 14).



**Figure 61.** Spectres infrarouge agrandit sur la bande amide I entre  $1600$  et  $1690\text{ cm}^{-1}$  du peptide RWWF9 (spectre noir). Les spectres représentent le signal du peptide (5 nmoles) en solution **(A)**, en présence de DOPC **(B)** et de DOPC/DOPG (4:1) **(C)**. Le spectre de déconvolution est représenté en noir pointillé et les bandes de chaque structure secondaire sont représentées : coude  $\beta$  (gris;  $1670\text{ cm}^{-1}$ ), hélice  $\alpha$  (bleu;  $1656\text{ cm}^{-1}$ ), random coil (orange;  $1646\text{ cm}^{-1}$ ) et feuillet  $\beta$  (vert;  $1633\text{ cm}^{-1}$ ).

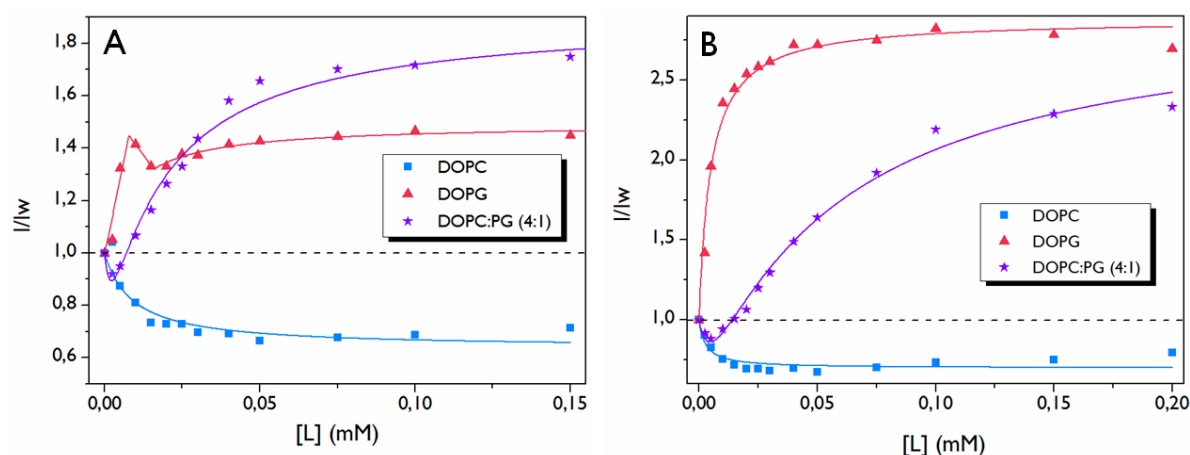
	Tampon				DOPC				DOPC:DOPG (4:1)			
Peptides	RC	H $\alpha$	F $\beta$	C $\beta$	RC	H $\alpha$	F $\beta$	C $\beta$	RC	H $\alpha$	F $\beta$	C $\beta$
RFFF9	19	35	32	14	24	37	11	28	20	41	27	12
RWFF9	29	41	11	19	28	46	12	14	30	28	31	11
RFWF9	22	33	19	26	19	34	20	27	32	33	28	7
RFWW9	52	26	7	15	23	38	27	12	29	37	26	8
RWWF9	30	31	22	17	25	38	22	15	31	40	18	11

**Tableau 14.** Pourcentages de structure secondaires (RC: random coil; H $\alpha$ : hélice  $\alpha$ ; F $\beta$ : feuillet  $\beta$ ; C $\beta$ : coude  $\beta$ ) déterminés par ATR-FTIR suite aux déconvolutions présentées dans la Figure 61 pour tous les peptides (5 nmoles) en solution et en présence de DOPC et de DOPC/DOPG (4:1).

## VI. Partition et affinité des RX9 pour des membranes modèles

- Spectroscopie de fluorescence du Trp

La fluorescence du Trp intrinsèque aux peptides a été employée pour caractériser la partition des analogues RX9 dans des modèles membranaires. Le coefficient de partition de Nernst ( $K_p$ ) a été calculé en effectuant des titrations de concentration fixe de peptide ( $0.5 \mu\text{M}$ ) et à partir de l'intensité de fluorescence ( $I$ ) en fonction de la concentration lipidique ( $[L]$ ) comme cela a été décrit précédemment [208; 209] (Figure 62). L'analyse des données a été réalisée grâce à la méthode décrite par Melo et collaborateurs [210]. Le coefficient  $K_p$  est le ratio entre la concentration de peptide lié à la membrane et de peptide en phase aqueuse. Pour tous les systèmes lipidiques nous avons calculé des  $K_p$  d'un ordre de grandeur  $10^5$  mettant en évidence l'importance des interactions électrostatiques lors de la reconnaissance P/L [211] (Tableau 15). Ces constantes sont en accord avec le fait que les peptides RX9 établissent d'importantes interactions électrostatiques avec les charges négatives des groupes phosphates des têtes polaires des lipides (ils sont positivement chargés à pH 7 (6+)). Les constantes de partition se sont avérées similaires pour RW9 et les différents analogues RX9.



**Figure 62.** Courbe de partition du peptide RW9 (A) et du peptide RFWW9 (B) en présence de LUVs de DOPC, DOPG et de DOPC/DOPG (4:1)

Cependant, même si les  $K_p$  obtenus pour les RX9 et RW9 ne sont pas significativement différents, les courbes de partition sont très différentes en fonction de la composition lipidique des LUVs.

Dans le cas des liposomes de DOPC, l'intensité de fluorescence des peptides diminue en présence de liposomes avec un comportement hyperbolique mais aucun décalage du maximum de longueur d'onde de fluorescence n'apparaît ("blue-shift" ou "red-shift"). Cela résulte d'une inhibition de la fluorescence du Trp suite à l'interaction des peptides avec les têtes polaires des lipides. Cependant, l'absence de décalage du maximum de longueur d'onde en présence de lipides suggère que le peptide peut être adsorbé sur la surface de la membrane avec le même environnement hydrophile qu'en solution et ne s'insère pas profondément dans le cœur hydrophobe.

Le profil de la courbe d'ajustement des données est légèrement différent pour des liposomes de DOPC/DOPG (4:1). La même diminution de l'intensité de fluorescence a été observée à de faibles concentrations de lipides puis une augmentation hyperbolique apparaît à de plus fortes concentrations de lipides avec un blue-shift de  $\sim 10$  nm du maximum d'intensité de fluorescence. Ce comportement a déjà été observé et décrit dans la littérature et cela résulte d'une auto-inhibition du peptide lors de son insertion dans la bicouche [210; 212]. Les Trp s'insèrent plus profondément dans la région des chaînes d'acides gras de la membrane en modifiant leur environnement en un environnement plus hydrophobe.

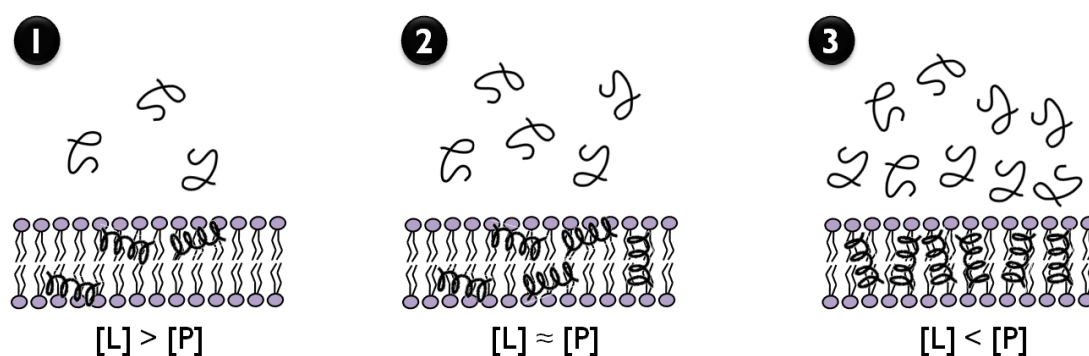
Ce comportement différent en termes de fluorescence du Trp en présence de lipides anioniques a été confirmé grâce à des expériences en présence de LUVs composées entièrement de lipides anioniques (100 % de DOPG). Dans ce cas, pour les peptides RFWF9, RFWW9 et RWWF9, le profil de la courbe de partitionnement est hyperbolique (Figure 62B). Pour certains peptides (RW9 et RWFF9), un mécanisme en 3 étapes a été observé en présence de lipides anioniques (DOPG) (Figure 62A). L'analyse de ces résultats a été réalisée grâce aux données de Melo et collaborateurs [210-212] et grâce à l'aide de M. N. Melo pour le modèle d'ajustement des courbes en 3 phases. Ces auteurs décrivent le processus de partitionnement des peptides dans des bicouches anioniques en 3 étapes (Figure 63).

La première étape correspond à une faible concentration de peptide en présence de lipides, où le peptide interagit avec la membrane et s'insère dans la bicouche. C'est une phase non-saturante où la fraction de peptide dans la membrane est dictée par le coefficient de partition. La variation d'intensité  $I/I_w$  (où  $I$  représente l'intensité de fluorescence du peptide en présence de lipides et  $I_w$  l'intensité de fluorescence du peptide en solution) est linéaire et atteint une concentration critique qui correspond à la limite de solubilité du peptide en milieu aqueux.

La deuxième étape correspond à des concentrations de peptide proches de celle des lipides. Cela entraîne un réarrangement conformationnel du peptide et deux populations de peptides coexistent dans la membrane : peptide saturé et non-saturé. L'intensité  $I/I_w$  diminue à cette étape du fait de l'inhibition de fluorescence des Trp.

La troisième étape correspond à un état où une concentration élevée de peptide où la membrane est complètement saturée de peptide. Celui-ci n'est présent qu'en conformation saturé et l'intensité de fluorescence augmente à nouveau jusqu'à atteindre un plateau de saturation.

Dans nos expériences nous avons observé un comportement similaire en 3 étapes en présence de lipides anioniques et pour certains peptides.



**Figure 63.** Modèle de saturation de la bicouche par un peptide en 3 étapes. 1. Etape de non-saturation ; 2. Etape intermédiaire 3. Etape de saturation de la membrane. Figure tirée de [210].

Dans la première phase, à faible concentration de peptide (ratio P/L bas), le maximum d'intensité de fluorescence augmente mais aucun blue-shift n'apparaît indiquant que le peptide interagit avec la membrane sans s'insérer profondément dans le cœur hydrophobe. Ce premier contact superficiel peut être la conséquence d'interactions électrostatiques entre les Arg et les charges négatives du DOPG.

Dans la seconde phase, à de plus fortes concentrations en lipides, un « blue-shift » important a été observé (~ 20 nm) avec une légère diminution de l'intensité de fluorescence pour certains peptides.

Dans la troisième phase, l'intensité de fluorescence et la longueur d'onde du maximum de fluorescence atteignent un plateau.

Cette augmentation du maximum de fluorescence est le résultat d'un effet de solvant qui augmente le rendement quantique de fluorescence des Trp et qui est aussi mis en évidence par le « blue-shift » observé. Cela correspond à une profonde insertion dans la bicouche avec les résidus Trp orientés vers le cœur hydrophobe de la membrane.

Ce modèle d'interaction en 2 étapes avec la membrane a également été proposé par Walrant et collaborateurs pour RW9. Ils ont montré par des études de modélisation qu'au cours d'une première étape, les Arg agissent comme des charnières grâce aux interactions électrostatiques avec les lipides anioniques puis, en deuxième étape, les Trp basculent vers l'intérieur de la membrane conduisant à une insertion plus profonde (les Arg restant toujours accrochés aux têtes polaires) [170].

	<b>K<sub>p</sub> (.10<sup>5</sup>)</b>		
	<b>DOPC</b>	<b>DOPC/DOPG (4 :1)</b>	<b>DOPG</b>
<b>RW9</b>	2.0 ± 0.8	3.8 ± 0.2	1.5 ± 0.6
<b>RWFF9</b>	4.6 ± 0.5	3.1 ± 0.5	1.6 ± 0.2
<b>RFWF9</b>	2.15 ± 0.05	1.765 ± 0.005	1.88 ± 0.07
<b>RFWW9</b>	3.4 ± 0.7	1.77 ± 0.06	2.51 ± 0.07
<b>RWWF9</b>	3.0 ± 0.5	0.9 ± 0.6	1.4 ± 0.2

**Tableau 15.** Coefficients de partition déterminés par spectroscopie de fluorescence du Trp en présence de LUVs de DOPC, DOPC/DOPG (4:1 mol:mol) et de DOPG. La concentration initiale de peptide est de 0.5 µM.



Les  $K_p$  observés sont similaires parmi les RX9, mais de façon plus surprenante, ils sont similaires entre les différents systèmes lipidiques. Cela indique que la proportion de peptide lié à la membrane, comparé à la proportion de peptide libre (en milieu aqueux), est la même quelque soit la composition de la membrane même si la cinétique d'interaction et leur affinité d'interaction peuvent être différentes (cet aspect sera décrit plus bas). Le nombre et la position des Trp ne semblent pas affecter le partitionnement des peptides dans la membrane indiquant que les interactions électrostatiques jouent un rôle majeur. Cet aspect est confirmé par les valeurs de  $K_p$  qui sont très élevées ( $10^5$ ) et reflètent la présence d'interactions électrostatiques fortes.

$I_L/I_w$	<b>RW9</b>	<b>RWFF9</b>	<b>RFWF9</b>	<b>RFWW9</b>	<b>RWWF9</b>
<b>DOPC</b>	$0.60 \pm 0.06$	$0.71 \pm 0.05$	$0.69 \pm 0.02$	$0.66 \pm 0.04$	$0.54 \pm 0.03$
<b>DOPG</b>	$1.5 \pm 0.2$	$1.7 \pm 0.4$	$2.04 \pm 0.06$	$2.7 \pm 0.1$	$1.7 \pm 0.1$
<b>DOPC/DOPG</b>	$1.8 \pm 0.1$	$2.2 \pm 0.4$	$2.8 \pm 0.2$	$3.1 \pm 0.2$	$2.15 \pm 0.05$

**Tableau 16.** Valeurs de  $I_L/I_w$  pour chaque analogues RX9 en présence de LUVs de DOPC, DOPG et DOPC/DOPG (4 : 1 mol:mol).

Les valeurs de  $I_L/I_w$  sont présentées dans le Tableau 16. Ce paramètre correspond à la valeur de  $I/I_w$  en présence de concentration saturante de lipides (lorsque  $[L] \rightarrow \infty$ ).

Différentes valeurs de  $I_L/I_w$  soulignent le fait que des changements conformationnels du peptide se déroulent lors de l'interaction P/L. Deux cas peuvent avoir lieu :

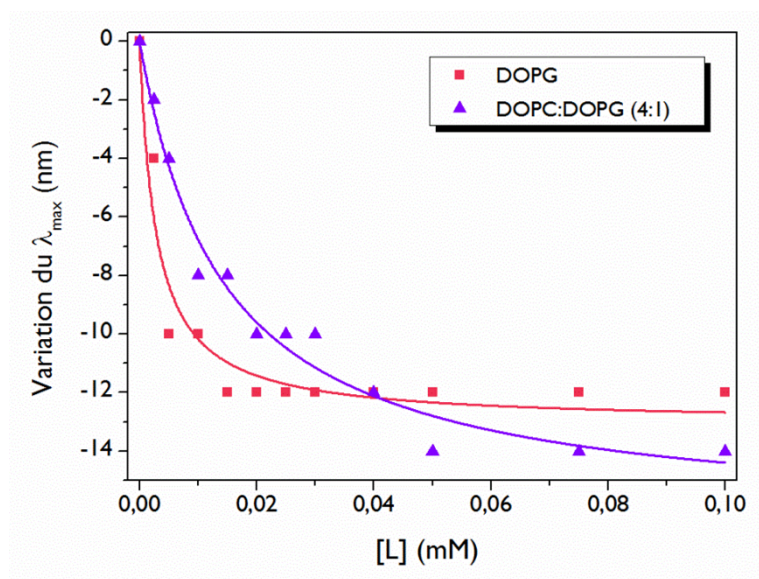
$I_L/I_w < 1$  alors  $I_L < I_w$  : diminution du rendement quantique de fluorescence

$I_L/I_w > 1$  alors  $I_L > I_w$  : augmentation du rendement quantique de fluorescence

Dans le cas des liposomes de DOPC nous avons observé une valeur de  $I_L/I_w < 1$ , qui signifie qu'il y a une inhibition du rendement quantique de fluorescence démontrant une interaction P/L de nature électrostatique.

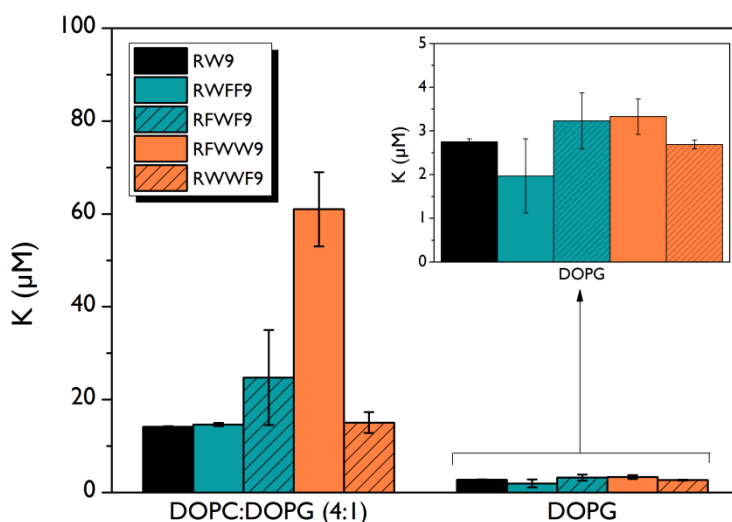
Dans le cas des liposomes de DOPG et de DOPC/DOPG (4 :1) une valeur de  $I_L/I_W > 1$  a été observée, démontrant une augmentation du rendement quantique de fluorescence et donc une diminution de la polarité lors de l'interaction P/L. Les valeurs de  $I_L/I_W$  pour les liposomes de DOPG sont inférieures à celles des liposomes de DOPC/DOPG et indique une interaction préférentielle des peptides pour la surface de la membrane de DOPG. En effet, cela reflète une exposition plus élevée des Trp à un environnement polaire.

A partir des données obtenues grâce au décalage du maximum de longueur d'onde observé avec les liposomes anioniques (DOPG et DOPC/DOPG), nous avons pu déterminer une constante de "demi-liaison" correspondant à la concentration nécessaire de lipides pour atteindre 50 % du blue-shift (Figure 64). Ces valeurs sont parfois confondues avec la constante de dissociation ( $K_d$ ) dans la littérature. Nous ne pouvons cependant pas employer ce formalisme dans le cas où nos peptides possèdent plusieurs Trp car différents facteurs peuvent influencer la fluorescence du Trp (auto-inhibition de la fluorescence, ...) en fonction de leur localisation dans la membrane.



**Figure 64.** Variation du  $\lambda_{max}$  pour le peptide RWFF9 en présence de concentrations croissantes de LUVs de DOPG et de DOPC/DOPG (4:1 mol:mol).

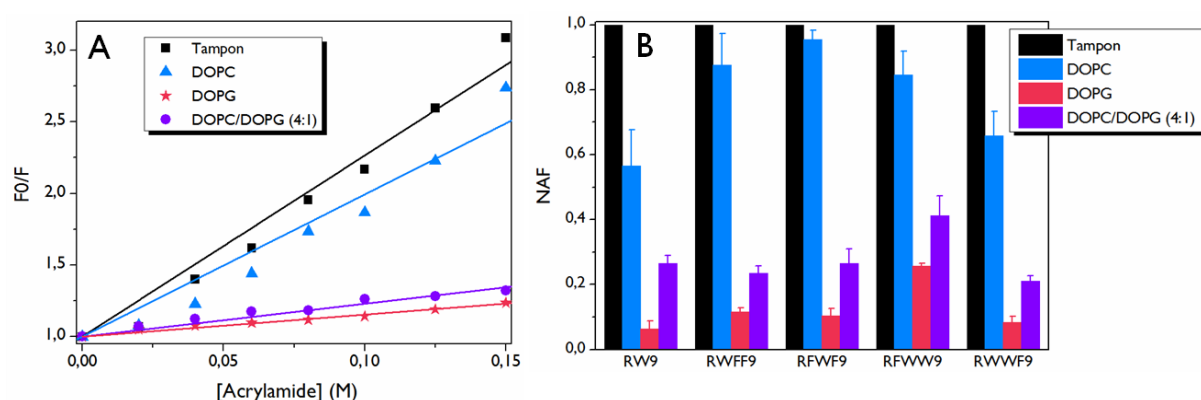
Cette concentration de « demi-liaison » est beaucoup plus faible pour les vésicules de DOPG que de DOPC/DOPG (Figure 65). Cela confirme une interaction des peptides avec la membrane favorisée en présence de lipides anioniques. Ces données rejoignent les résultats observés par Christiaens et collaborateurs [204] qui observent des  $K_d$  de la pénétratine avec des liposomes zwitterioniques et anioniques de l'ordre du  $\mu\text{M}$ . Le peptide RFWW9 est le peptide le moins affin pour les LUVs de DOPC/DOPG et cela corrobore les résultats observés par quantification de peptide lié à la membrane où ce peptide est celui qui s'accumule le moins à la membrane.



**Figure 65.** Constantes de "demi-liaison" ( $K$ ) déterminées par l'analyse des variations du  $\lambda_{\text{max}}$  des Trp en présence de LUVs de DOPG et de DOPC/DOPG (4:1 mol:mol).

Afin de mieux examiner l'insertion du peptide dans les liposomes de différentes compositions, nous avons calculé la constante de Stern-Volmer ( $K_{\text{SV}}$ ) en réalisant des expériences d'inhibition de fluorescence par l'acrylamide (Figure 66A). Ces constantes ont été normalisées par rapport au  $K_{\text{SV}}$  dans le tampon (accessibilité maximale des Trp à l'acrylamide) et cela nous a permis d'obtenir le facteur d'accessibilité normalisé (naf) (Figure 66B).

Ce facteur nous permet de comparer des degrés d'accessibilité parmi les différents peptides. Les données montrent que les résidus Trp de tous les analogues RX9 en présence de lipides zwitterioniques sont majoritairement exposés au tampon (60 à 90 % d'accessibilité). En présence de liposomes partiellement anioniques (DOPC/DOPG 4 :1), ils sont plus enfouis dans la membrane (20 à 30 % d'accessibilité) et presque entièrement enfouis dans des liposomes constitués de 100 % de DOPG (10 à 20 % d'accessibilité). Cependant, aucune différence significative n'a été observée entre les analogues RX9 et RW9.

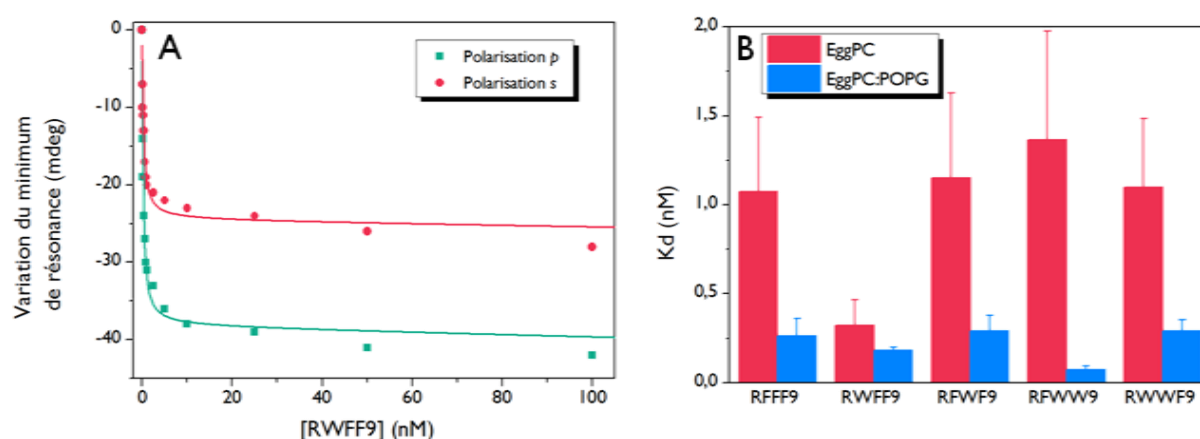


**Figure 66.** Quenching de fluorescence du Trp par ajout de concentrations croissantes d'acrylamide en présence de LUVs de DOPC, DOPG et de DOPC/DOPG (4:1 mol :mol). **(A)** Titrations du peptide RWFF9 en présence ou en absence de LUVs. **(B)** Facteur d'accessibilité normalisé pour RW9 et les analogues RX9.

- Résonance Plasmonique aux Ondes guidées (PWR)

La résonance plasmonique aux ondes guidées (PWR) a été utilisée afin d'étudier l'affinité des RX9 pour des lipides zwitterioniques et anioniques ainsi que leur effet sur l'organisation de la membrane. Après l'ajout de peptides à des concentrations croissantes, une diminution de l'angle de résonance a été observée pour les deux polarisations *p* et *s* indiquant une diminution de la masse du système déposé sur le prisme (Figure 67A). Cet effet est soit le résultat d'un effet détergent du peptide conduisant à un enlèvement partiel des lipides de la membrane, soit une réorganisation des lipides induite par le peptide et augmentant l'aire occupée par chaque molécule de lipides.

En suivant les décalages du minimum de l'angle de résonance après ajout de concentrations croissantes de peptides et en ajustant ces données avec une courbe hyperbolique, les constantes de dissociation apparentes ( $K_d$ ) peuvent être obtenues (Figure 67B). Une affinité de l'ordre du nM a été observée pour tous les peptides et pour chaque composition de la membrane. Cependant, l'affinité du peptide est plus élevée pour des membranes anioniques ( $K_d \sim 1$  nM pour les membranes zwitterioniques et  $\sim 0.2$  nM pour les membranes anioniques). Ces résultats sont en accord avec les résultats obtenus par les études de fluorescence du Trp ( $K_{SV}$  et constantes de "demi-liaison") présentées précédemment. Cela confirme que l'interaction et l'insertion du peptide est favorisée en présence de lipides anioniques.

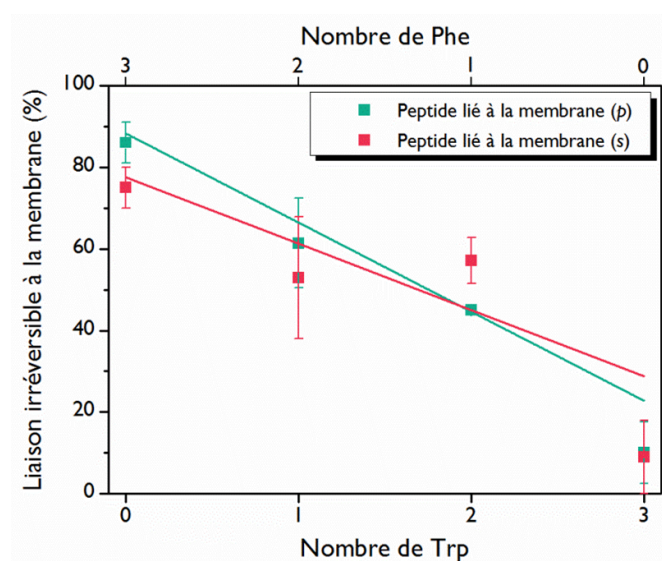


**Figure 67. (A)** Variation du minimum de résonance après l'ajout du peptide RWFF9 pour les polarisations  $p$  et  $s$ . **(B)** Constantes de dissociation apparentes moyennées entre les polarisations  $p$  et  $s$  obtenues à partir des expériences de PWR sur des membranes de EggPC ou d'EggPC/POPG (4:1 mol:mol).

Après avoir atteint le plateau de saturation du peptide, la membrane a été "lavée" grâce à un flux de tampon dans la cellule, afin de tester si la liaison des peptides et leur effet sur les membranes est réversible. Dans ces expériences, nous avons observé une corrélation entre le nombre de résidus Trp et la réversibilité de l'interaction (Figure 68). En effet, moins il y a de résidus Trp, moins l'interaction est réversible. Nous interprétons cette observation comme suit : les résidus Phe étant plus hydrophobes que les Trp, ils permettent au peptide d'être plus profondément enfouis dans la membrane et dans une configuration moins réversible et plus permanente.

Dans le cas de RW9, le "rinçage de la membrane" conduit à une récupération complète du signal de la membrane obtenu avant l'ajout du peptide : la liaison de RW9 est donc complètement réversible.

Ces données nous conduisent à penser que l'aromaticité des acides aminés est importante pour la translocation des peptides mais surtout une forte hydrophobicité de tels résidus ralentit voire empêche cette translocation à cause d'une interaction plus profonde et/ou plus irréversible des peptides avec les lipides membranaires.



**Figure 68.** Pourcentage de peptide "résistant au lavage" ou lié à la membrane de manière irréversible après une étape de lavage de la cellule (2mL) représenté en fonction du nombre de Trp.

## VII. Insertion des peptides dans les membranes

- Fluorescence du Trp en présence de vésicules lipidiques bromées

Les études d'inhibition de fluorescence du Trp par des liposomes bromés nous fournissent des informations concernant le niveau d'insertion des peptides dans les membranes. La profondeur d'insertion des Trp par rapport au centre de la bicouche a été obtenue pour les analogues RX9 en présence de LUVs de DOPC/DOPG (4:1).

Le niveau d'insertion des RX9 et de RW9 est d'environ 10-11 Å du centre de la bicouche, d'après nos analyses par les méthodes d'Analyse de Distribution (DA) et Parallax (PM) (Tableau 17) (voir le Chapitre V, Matériels & Méthodes pour plus de détails). Les résidus Trp sont donc localisés juste en dessous des têtes polaires des lipides.

Les peptides composés de 2 Phe semblent légèrement plus insérés dans la bicouche (~ 9 Å) tandis que les peptides composés de 1 Phe semblent les moins insérés dans la membrane (~ 11 Å). Cela est en accord avec la réversibilité de liaison des peptides observée avec les expériences de PWR. Les études montrent que l'hydrophobicité plus élevée des Phe joue un rôle important dans l'insertion et la profondeur d'insertion des peptides dans des membranes anioniques.

	DA			PM	
	$h_m$ (Å)	$\sigma$ (Å)	S	$h_m$ (Å)	$R_c$ (Å)
<b>RW9</b>	$10.4 \pm 0.9$	$5.8 \pm 1.2$	$1.3 \pm 0.5$	$10.2 \pm 0.7$	$8.2 \pm 1.4$
<b>RWFF9</b>	$9.7 \pm 0.5$	$2.6 \pm 0.4$	$0.6 \pm 0.1$	$9.9 \pm 0.8$	$4.8 \pm 1.2$
<b>RFWF9</b>	$9.9 \pm 0.2$	$2.3 \pm 0.4$	$0.3 \pm 0.1$	$10.6 \pm 0.9$	$5.1 \pm 0.4$
<b>RFWW9</b>	$11.2 \pm 1$	$2.9 \pm 1$	$0.7 \pm 0.5$	$12.7 \pm 0.1$	$7 \pm 1$
<b>RWWF9</b>	$11 \pm 0.8$	$3.8 \pm 1.2$	$0.9 \pm 0.6$	$11.1 \pm 0.5$	$6.5 \pm 1.3$

**Tableau 17.** Profondeur d'insertion moyenne des peptides dans des LUVs de DOPC/DOPG (4:1 mol:mol) à un ratio P/L 1/50 déterminées par les méthodes d'Analyse de distribution (DA) et Parallax (PM) avec les paramètres respectifs de chaque méthode.

Si l'on assume que les peptides sont principalement structurés en conformation hélicoïdale, le squelette peptidique devrait être localisé à environ 16 Å du centre de la bicouche. Les données de MD obtenues pour RW9 montrent une profondeur d'insertion de 14 Å du centre de la bicouche dans des membranes anioniques [170]. Ces résultats sont comparables, la petite différence observée peut découler des différences d'échelle de temps entre ces deux expériences qui sont bien plus long dans nos études qu'en MD.

Nous n'avons pas pu obtenir de résultats pour des LUVs de DOPC. Cela peut être dû au fait que les peptides interagissent plus superficiellement et avec une affinité plus faible avec les liposomes zwitterioniques qu'avec les liposomes anioniques.

- Infrarouge à Transformée de Fourier en Réflexion Totale Atténuée (ATR-FTIR)

L'effet des peptides sur l'orientation et l'organisation des lipides a été étudié par des expériences d'ATR-FTIR. Ces expériences nous permettent de calculer le ratio dichroïque ( $R_{ATR}$ ) relatif aux bandes  $CH_2$  (vs  $CH_2$ ) des chaînes lipidiques (vers  $2853\text{ cm}^{-1}$ ) et de quelle façon celles-ci sont affectées par les peptides. Le rapport dichroïque est défini à partir du rapport de l'absorbance en polarisation  $p$  ( $A_p$ ) sur l'absorbance en polarisation  $s$  ( $A_s$ ). Ce ratio nous fournit donc des informations sur l'effet des peptides sur l'organisation des chaînes lipidiques et leur orientation.

Nous avons observé une légère augmentation du  $R_{ATR}$  des membranes de DOPC de la plupart des analogues RX9 (excepté RWFF9) correspondant à une légère désorganisation de la bicouche (Tableau 18).

Au contraire une légère diminution du  $R_{ATR}$  a été observée avec des membranes anioniques (DOPC/DOPG 4:1 mol:mol) indiquant que le peptide conduit à une organisation de ces lipides. Cela résulte probablement du fait que l'interaction des peptides avec les lipides anioniques conduit à une diminution des forces répulsives entre les têtes polaires des lipides et ainsi une augmentation de l'organisation et de l'ordre des lipides dans la membrane.

Peptides	DOPC	+ Peptide	DOPC/DOPG	+ Peptide
<b>RFFF9</b>	$1.45 \pm 0.1$	$1.62 \pm 0.08$	$1.4 \pm 0.09$	$1.42 \pm 0.03$
<b>RWFF9</b>	$1.53 \pm 0.1$	$1.47 \pm 0.1$	$1.5 \pm 0.06$	$1.35 \pm 0.1$
<b>RFWF9</b>	$1.44 \pm 0.1$	$1.5 \pm 0.1$	$1.41 \pm 0.05$	$1.33 \pm 0.05$
<b>RFWW9</b>	$1.39 \pm 0.07$	$1.46 \pm 0.01$	$1.39 \pm 0.07$	$1.38 \pm 0.05$
<b>RWWF9</b>	$1.28 \pm 0.09$	$1.4 \pm 0.1$	$1.4 \pm 0.04$	$1.37 \pm 0.09$

**Tableau 18.** Variation des  $R_{ATR}$  pour des membranes de DOPC et de DOPC/DOPG (4:1 mol:mol) pour les analogues RX9 (5 nmoles).

Ces résultats sont en accord avec les expériences de fuite de calcéïne où aucune fuite n'a été observée avec les lipides anioniques et une légère fuite du fluorophore est apparue en présence de lipides zwitterioniques.



Cependant, aucune différence significative n'a été mise en évidence parmi les analogues RX9 nous permettant de conclure que la perturbation membranaire induite par les peptides n'est pas une propriété qui peut expliquer les différences d'internalisation cellulaire.

### **VIII. Internalisation des CPPs dans les liposomes**

Avant d'étudier l'interaction peptide/lipide et les perturbations induites par les peptides sur l'organisation lipidique pouvant expliquer leur translocation directe, il est intéressant de savoir si les peptides sont internalisés dans des liposomes. Jusqu'à aujourd'hui la majorité des méthodes de quantification d'internalisation des CPPs sont basées sur la fluorescence de sondes rajoutées aux CPPs. Cependant, l'ajout de sondes fluorescentes couplées aux CPPs n'est pas anodin car les propriétés physico-chimiques, la capacité d'internalisation et même la toxicité des CPPs sont fortement affectés par ces sondes [50; 169; 205]. Ainsi, le plus convenable est de modifier au minimum ou de ne pas du tout modifier les CPPs.

Sur cette base, nous avons souhaité créer un protocole sans marquage des peptides dans lequel des liposomes utilisant la fluorescence intrinsèque des résidus Trp naturellement présents dans les CPPs et les propriétés d'inhibition de fluorescence par l'acrylamide afin de tester l'internalisation des CPPs dans des LUVs.

L'objectif de cette expérience est de mesurer la translocation des peptides dans des liposomes de compositions lipidiques zwitterioniques (DOPC) et anioniques (DOPG). Nous avons donc préparé des LUVs chargées en acrylamide et en calcéine. La calcéine nous permet de vérifier la stabilité des liposomes par la mesure de fluorescence à la longueur d'onde d'émission de la calcéine (515 nm) et aussi de suivre les liposomes au moment de la séparation de l'acrylamide libre en solution par chromatographie de gel filtration. L'acrylamide est employé comme inhibiteur de la fluorescence du Trp et va agir sur les peptides (inhibition de la fluorescence) qui seront internalisés dans les liposomes.

Plusieurs problèmes surviennent lors du développement de cette méthode :

1. Le principal problème de cette approche est qu'on ne sait pas si l'acrylamide diffuse à travers les membranes de nos liposomes. Pour cela un contrôle doit être effectué avec une molécule de Trp qui ne s'insère théoriquement pas dans les bicouches.
2. Un autre inconvénient réside dans le fait que le peptide étudié ne doit pas induire de fuites des liposomes et ne doit pas entraîner de fuites de l'acrylamide.
3. Même si la mesure de fuite des liposomes est vérifiée grâce à des mesures de fuites de calcéine, la perturbation de la membrane pourrait aussi entraîner des fuites d'acrylamide sans induire de fuite de calcéine car la calcéine possède une masse moléculaire plus élevée que l'acrylamide ( $MW_{\text{calcéine}} = 622 \text{ Da}$  ;  $MW_{\text{acrylamide}} = 71 \text{ Da}$ ).

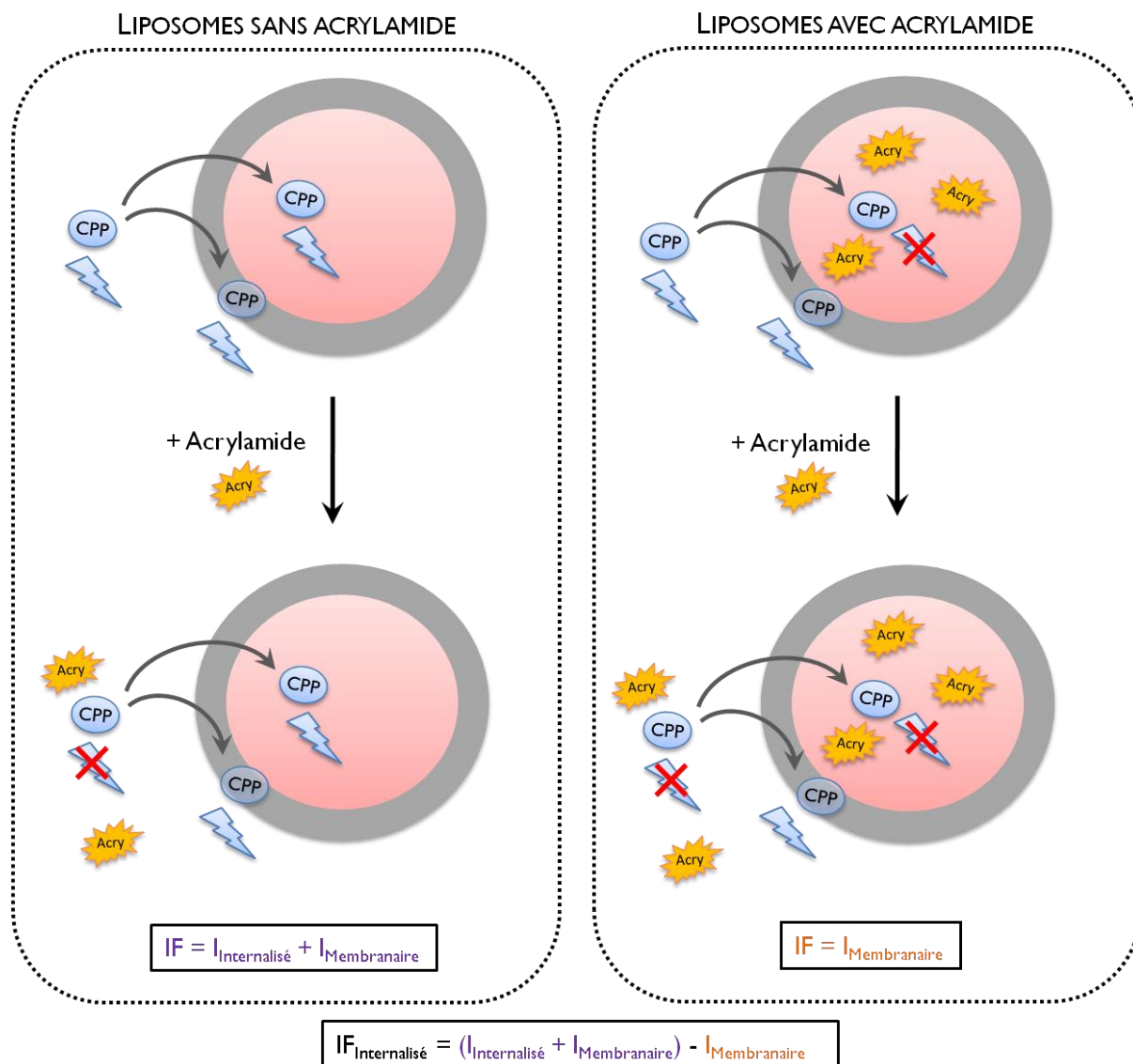
Ces obstacles potentiels doivent être contrôlés pendant les mesures et seront discutés plus bas.

L'expérience consiste à suivre l'intensité de fluorescence du Trp lors de l'ajout de CPPs à des liposomes encapsulant ou pas de l'acrylamide et, à la fin de chaque expérience (après 15 minutes d'incubation peptide/liposomes), de rajouter 100 mM d'acrylamide permettant d'inhiber la fluorescence du peptide qui est à l'extérieur des liposomes.

En préparant des liposomes avec et sans acrylamide encapsulé et en rajoutant de l'acrylamide à la fin de la mesure, ces différents paramètres expérimentaux permettent de déterminer la quantité de peptide membranaire et internalisé (dans le cas des liposomes sans acrylamide encapsulé) et la quantité de peptide membranaire (dans le cas des liposomes avec acrylamide encapsulé).

La différence entre les deux ( $[\text{membranaire} + \text{internalisé}] - [\text{membranaire}]$ ) permet enfin de déterminer le pourcentage de peptide internalisé dans les liposomes (Figure 69).

Des mesures de contrôle (avec des liposomes encapsulant ou pas de l'acrylamide) ont été réalisées avec du Trp libre en solution afin d'avoir un système qui ne s'internalise pas et de pouvoir déterminer si l'acrylamide fuit des liposomes en cours de mesure. La concentration de lipide et de peptide est toujours similaire entre les différentes mesures afin de pouvoir bien comparer les différents systèmes.



**Figure 69.** Schéma du protocole de quantification de l'internalisation de CPPs riches en Trp dans des liposomes. Sur la partie gauche l'expérience est représentée en présence de liposomes sans acrylamide et la partie droite correspond à l'expérience en présence de liposomes chargés en acrylamide.

Ainsi, 4 types de mesures ont été effectuées.

Deux types de mesures pour le contrôle avec le Trp :

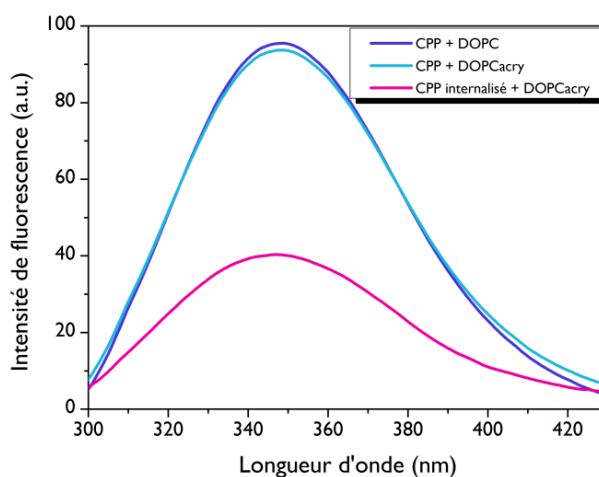
- I. Le Trp a été incubé en présence de LUVs de DOPC ou de DOPG sans acrylamide (Figure 71A où CPP correspond au Trp). Cette expérience doit permettre de vérifier si le Trp interagit avec la membrane des liposomes.

2. Le Trp a été incubé en présence de LUVs de DOPC ou de DOPG chargées en acrylamide (Figure 71B où CPP correspond au Trp). Cette expérience avec la première doit permettre de vérifier si l'acrylamide fuit hors des liposomes.

Deux types de mesure avec le peptide vecteur RW9 :

3. RW9 a été incubé en présence de LUVs de DOPC ou de DOPC sans acrylamide (Figure 71C). Cette expérience, après l'ajout d'acrylamide à la fin, doit permettre de déterminer la quantité de peptide qui est internalisé et aussi enfoui dans la membrane (non inhibé).
4. RW9 a été incubé en présence de LUVs de DOPG ou de DOPG chargées en acrylamide (Figure 71D). Cette mesure permettra de déterminer la quantité de peptide membranaire (suite à l'ajout d'acrylamide à l'extérieur des LUVs) car seul le peptide enfoui dans la membrane (hors contact avec acrylamide) ne sera pas inhibé.

Dans les 4 expériences décrites plus haut, l'acrylamide a été rajouté à la fin afin d'inhiber la fluorescence des CPPs restant à l'extérieur des liposomes et donc accessibles. Les spectres de fluorescence qui devraient être observées pour un CPP contenant des Trp sont représentés dans la Figure 70 et les variations de l'intensité de fluorescence du Trp et de RW9 lors des étapes décrites plus haut sont présentées dans la Figure 71.



**Figure 70.** Exemple de spectres de fluorescence que l'on obtiendrait théoriquement pour observer l'internalisation des CPPs dans des LUVs de DOPC sans acrylamide (courbe bleu foncée) ou avec acrylamide (courbes bleu claire et rose) et dans le cas où le peptide ne s'internalise pas (courbe bleu clair) ou dans le cas où le peptide s'internalise (courbe rose).

- Cas n°1 : Trp + LUVs de DOPC (Figure 71A) :

Une forte augmentation de l'intensité de fluorescence a été observée en présence de LUVs de DOPC indiquant que l'environnement des Trp devient plus apolaire et que les Trp s'insèrent dans le cœur hydrophobe de la bicouche.

Cela est en accord avec la présence d'interactions  $\pi$ -cations qui peuvent être établies entre le Trp et les charges positives des têtes polaires lipidiques. En présence de LUVs chargées en acrylamide, cette augmentation d'intensité est moins prononcée (inhibition de 55%) et montre que l'acrylamide présent dans les LUVs inhibe la fluorescence du Trp. Cela peut-être dû à l'enfouissement des Trp dans la membrane lipidique ou internalisé et donc accessible à l'acrylamide et/ou à une légère fuite de l'acrylamide à l'extérieur des LUVs.

- Cas n°2 : Trp + LUVs de DOPG (Figure 71B) :

Une légère augmentation de l'intensité de fluorescence a été observée en présence de LUVs de DOPG indiquant que l'environnement des Trp devient légèrement plus apolaire et que les Trp restent plutôt à la surface des membranes anioniques. En présence de LUVs chargées en acrylamide, cette augmentation d'intensité est moins prononcée (inhibition de 46%) comme pour le DOPC et montre que l'acrylamide présent dans les LUVs inhibe la fluorescence du Trp dû aux raisons expliquées plus haut. Les différences observées en termes de « quenching » pour les deux systèmes lipidiques peuvent venir des différences en termes d'enfouissement dans la membrane du Trp dans les deux systèmes ainsi que la fuite d'acrylamide. Cette diminution est plus faible dans le cas des liposomes de DOPG et celle-ci pourrait donc être attribuée à une plus légère fuite de l'acrylamide. En effet, lors d'expériences de fuite de calcéine nous avons observé une légère fuite en présence de liposomes zwitterioniques et une fuite quasi-nulle dans le cas de liposomes anioniques.

Lorsque de l'acrylamide à 100 mM est ajouté aux différents systèmes, on observe une forte diminution de l'intensité de fluorescence du Trp. Cette diminution est due à une exposition importante du Trp, extérieur aux LUVs, à l'acrylamide. Cependant, cela montre qu'avec le DOPC, environ 20% de Trp sont inaccessibles à l'acrylamide alors qu'avec le DOPG 35% sont inaccessibles. Cela montre que le Trp s'est inséré de manière plus importante dans les LUVs de DOPG que de DOPC malgré le fait que son intensité de fluorescence ait moins augmenté. Nous n'avons pas trouvé d'explication logique à cette différence.

- Cas n°3 : RW9 + LUVs de DOPC (Figure 71C) :

Lorsque les expériences ont été réalisées avec le peptide RW9, nous avons mesuré une augmentation de l'intensité de fluorescence en présence de LUVs de DOPC résultant du contact et de l'insertion du peptide dans la membrane.

Une diminution de cette intensité en présence de liposomes chargés en acrylamide est observée et résulte d'une inhibition de fluorescence en raison de l'insertion du peptide dans la bicouche et/ou à son internalisation. Lorsque de l'acrylamide à 100 mM est ajouté dans la solution, il y a 41% d'inhibition de fluorescence et donc ~60% de fluorescence du peptide n'est pas inhibée. Ces 60% correspondent alors au peptide internalisé et membranaire. Lorsque l'acrylamide est ajouté au système RW9 + LUVs de DOPC chargées en acrylamide, on observe une diminution de l'intensité de fluorescence de 33%, ainsi 66 % de peptide n'est pas exposé à l'acrylamide. Dans ce cas, les 66% de peptides non-exposés à l'acrylamide correspondent au pourcentage de peptides membranaires. La différence entre peptide internalisé + peptide membranaire (obtenu avec les liposomes non chargés en acrylamide) et peptide membranaire (obtenu avec les liposomes chargés en acrylamide) nous donne la quantité de peptide internalisé. Cette expérience révèle que RW9 ne pénètre pas dans les liposomes de DOPC mais s'insère seulement dans les membranes. Ce résultat rejoint les expériences réalisées par Walrant et collaborateurs, où une détection par spectrométrie de masse a été utilisée afin de quantifier le peptide membranaire et internalisé, montrant que RW9 ne s'internalise pas dans des LUVs d'EggPC et que la quantité de peptide mesurée reste membranaire [213].

- Cas n°4 : RW9 + LUVs de DOPG (Figure 71D) :

Dans le cas des liposomes anioniques, une augmentation de l'intensité de fluorescence a été mesurée en présence de LUVs de DOPG plus élevée que pour des LUVs de DOPC. Ceci montre que RW9 s'insère plus profondément dans le cœur hydrophobe des membranes anioniques et confirme les résultats de fluorescence remarqués auparavant (Partie VI).

En présence de LUVs chargées en acrylamide, une augmentation de l'intensité est mesurée et cette augmentation d'intensité est plus forte (66%) que celle observée pour le RW9 en présence de LUVs de DOPC (52%) pouvant être expliquée par l'internalisation du peptide dans les liposomes. Lorsque l'acrylamide est ajouté dans la solution, nous avons mesuré 33% d'inhibition de fluorescence (donc 67% de peptide n'est pas inhibé) en présence de LUVs de DOPG et 39% (61% de peptide non inhibé) en présence de LUVs de DOPG chargées en acrylamide. Comme cela est expliqué plus, haut la différence entre ces deux valeurs permet de calculer la quantité de peptide internalisé qui est de 6%. Ce pourcentage correspondrait à une concentration de 300 nM et donc de 90 pmoles de peptide internalisé dans les liposomes de DOPG par rapport à la concentration de peptide incubé (5µM).

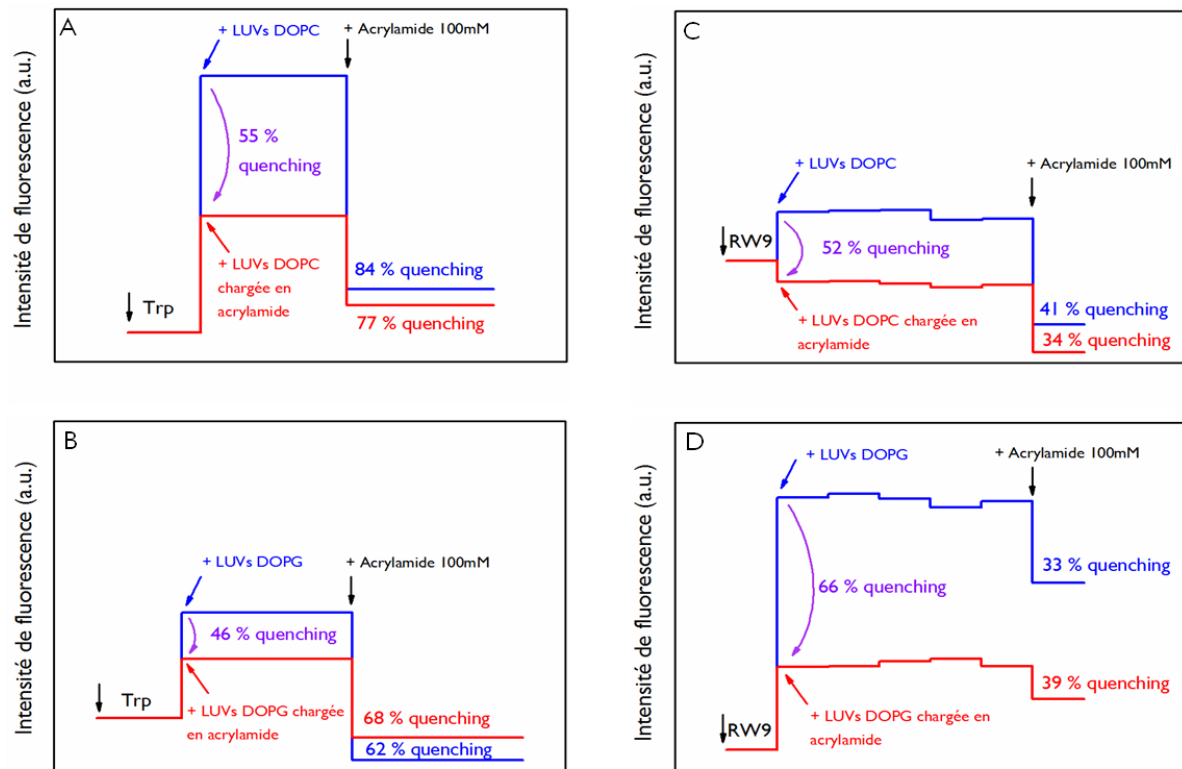
Des études reportées par Walrant et collaborateurs montrent également que RW9 est capable d'être internalisé dans les liposomes anioniques avec environ 21% de peptide internalisé sur la quantité totale de peptide incubé [213]. Ces expériences ont été effectuées suite à une incubation du peptide avec des liposomes pendant 120 min alors que dans notre cas, les incubations sont de 15 minutes, ce qui expliquerait le plus faible taux d'internalisation. Il faut noter que le ratio P/L appliqué dans nos expériences est le même que celui utilisé pour les expériences de Walrant et collaborateurs (P/L de 1/100).

La cinétique d'internalisation de RW9 dans des liposomes anioniques serait ainsi de 6% en 15 minutes et 21% en 120 minutes et la cinétique d'internalisation du peptide serait donc de type exponentiel. Si l'on compare ces résultats avec la cinétique obtenue par Mäger et collaborateurs pour le TPI0, ou par Jiao et collaborateurs pour le peptide Tat, on peut ajuster ces données avec une courbe d'association à une phase exponentielle et calculer une constante de vitesse de l'ordre de  $10^{-4} \text{ s}^{-1}$  [100; 214]. Cet ordre de grandeur est retrouvé pour les peptides étudiés par Mäger et collaborateurs et confirme ainsi la validité de notre protocole.

Afin de valider cette méthode comme méthode générale pour la quantification de l'internalisation des CPPs contenant des Trp, plusieurs aspects restent à tester :

- vérifier la quantité d'acrylamide qui fuit des liposomes ; s'il y a une fuite importante, il faut utiliser un autre inhibiteur de fluorescence, en sachant qu'il ne doit pas fuir des liposomes ni s'insérer dans la membrane ;
- faire ces mêmes mesures avec des peptides qui ne s'internalisent pas dans les LUVs ;
- faire ces mêmes mesures avec d'autres CPPs et d'autres compositions lipidiques ;

- augmenter les temps d'incubation avec le peptide afin de déterminer le plateau (maximum d'internalisation).



**Figure 71.** Variations des intensités de fluorescence du Trp (5 µM) (A et B) et de RW9 (5µM) (C et D) en présence de DOPC (A et C) et de DOPG (B et D).



## **IX. Conclusions et perspectives**

Dans ce chapitre nous avons étudié le rôle des Trp dans l'internalisation cellulaire et l'interaction membranaire du CPP RW9. Tandis que le rôle des Arg dans les séquences de CPPs a été amplement étudié et bien compris [215; 216], celui des résidus aromatiques a reçu beaucoup moins d'attention.

Pour RW9, le remplacement des Trp par des Leu a montré une perte d'efficacité de l'internalisation cellulaire pointant l'importance des résidus Trp [97].

Au contraire, R9 est connu comme un CPP performant d'après des études précédentes [73; 97], laissant place à des questions ouvertes sur le rôle des résidus aromatiques. Nos résultats ont montré que la substitution des Trp par des Phe dans la séquence de RW9 conduit à une forte diminution de l'internalisation cellulaire. Celle-ci est quasiment abolie dans le cas où tous les Trp sont remplacés par des Phe. Au contraire, l'accumulation de ces peptides à la membrane n'a pas été modifiée par ces substitutions. RW9 a montré dans des études précédentes qu'il peut être internalisé par endocytose et translocation directe de la membrane plasmique [97].

En comparant l'internalisation cellulaire de RW9 à 4°C et 37°C dans des cellules de type wild-type (wt) et des cellules CHO déficientes en GAGs, il a été montré que 85% des CPPs sont internalisés à 37 °C par les cellules sauvages (wt) par endocytose GAG-dépendante et 15% par translocation directe.

De plus, le rôle des Trp dans le recrutement des GAGs à la surface de la cellule pour déclencher l'endocytose a été étudié auparavant par des méthodes biophysiques [100; 103]. Bien que Rydberg et collaborateurs ont récemment mis en évidence que la position des Trp dans la séquence de dodécapeptides Arg/Trp affecte la cytotoxicité et la façon dont ces peptides interagissent avec les différents modèles membranaires, l'implication des Trp dans la translocation directe n'est pas encore totalement comprise [217; 218]. Nous avons réalisé une étude biophysique complète de RW9 et de ses dérivés RX9 afin de pouvoir interpréter leur propriété d'internalisation et mieux comprendre le rôle des Trp dans la translocation directe de la membrane plasmique. Nous avons montré qu'en présence de lipides leur structure secondaire n'est pas modifiée même s'ils sont principalement non-structurés. Contrairement à ce que la littérature suggère pour certains CPPs [219], l'internalisation cellulaire de ces peptides n'est donc pas directement corrélée à leur structure secondaire.

Malgré le fait que tous les peptides s'accumulent et se partitionnent de la même manière dans la membrane, nous avons conclu que leur ancrage dans la bicouche est directement dépendant de l'hydrophobicité et des propriétés interfaciales des acides aminés aromatiques. Les résidus Arg conduisent la liaison du peptide à la membrane et sont responsables de leur accumulation et de leur partition dans la membrane, expliquant cette interaction plus affine avec des lipides anioniques. Les résidus Arg jouent un rôle de charnière permettant l'insertion des résidus hydrophobes plus profondément dans la membrane. A ce niveau, la nature des résidus hydrophobes est préjudiciable à l'avenir du CPP en termes de réversibilité de la liaison à la membrane et de translocation finale de la membrane.

En effet, nos études révèlent que les résidus aromatiques aux propriétés moins hydrophobes et interfaciales vont aider les peptides à établir des interactions plus transitoires avec la membrane, en partie à cause d'une insertion moins profonde dans la membrane. Des interactions si malléables et des changements structuraux du peptide sont importants pour éviter au peptide d'être retenu dans le cœur de la membrane et pour déclencher la translocation des peptides à travers les membranes.

Cette étude démontre que non seulement le nombre mais aussi la nature et le positionnement des résidus hydrophobes, leur aromaticité et leurs propriétés interfaciales sont importants pour leur translocation. Les propriétés de pénétration cellulaire sont favorisées lorsque les Trp forment une région hydrophobe large. De plus, les résidus Trp en position 4 et 7 dans la séquence ont été mis en évidence comme des promoteurs des interactions  $\pi$ -cations qui semblent importantes pour masquer partiellement les charges du peptide et diminuer la barrière énergétique de la translocation de la membrane [97].

Enfin, l'interaction des peptides avec les membranes permet leur accumulation à la membrane mais une profonde insertion du peptide doit être évitée de façon à favoriser des interactions plus transitoires et permettre une translocation plus efficace de la membrane.

Ces travaux ont permis de comprendre en partie le rôle des Trp lors de l'internalisation des peptides vecteurs riches en Arg. Nous avons pu montrer grâce à des études biophysiques approfondies que les Trp n'ont pas un rôle prédominant au cours de l'interaction peptide/lipide mais peuvent fortement influencer la localisation du peptide dans la membrane entraînant une internalisation plus favorable des peptides qu'avec des acides aminés plus hydrophobes.

A travers la mutation des Trp en Phe, nous avons modifiés les capacités d'internalisation et d'interaction membranaire du peptide RW9 et cela a permis de mettre en évidence l'importance capitale de ces acides aminés. La compréhension de la translocation membranaire de ce type de peptide permettra une prédiction plus fine de leur comportement et l'amélioration de séquences peptidiques pour le transport intracellulaire de molécules thérapeutiques entre autres. Le choix de remplacer des Trp par des Phe nous a permis de comprendre que même la simple modification de l'hydrophobicité peut entraîner des changements comportementaux importants de ces peptides. Lors du remplacement par des Phe, acide aminé bien plus hydrophobe que le Trp, nous n'avons pu observer que de faibles changements de l'interaction membranaire des peptides. Les Trp auraient pu être remplacés par des Tyr, acide aminé aux propriétés interfaciales proches des Trp, mais moins hydrophobe. Cependant, les différences de comportements observés auraient été encore plus faibles.

Désormais, le couplage de molécules de type anticancéreux ou d'autres molécules afin de tester les capacités thérapeutiques de ce peptide vecteur pourrait être envisagé. Cela a été réalisé récemment par Cordier et collaborateurs pour le transport d'acides nucléiques peptidiques (PNA) grâce au peptide vecteur RW9 et a montré des résultats prometteurs [220].

Enfin, il peut désormais être envisagé la prédiction de séquences peptidiques de peptides vecteurs riches en Arg plus efficaces en termes d'internalisation et d'interaction avec les membranes. Cela nécessite notamment de choisir un nombre optimal de résidus dans la séquence et un bon équilibre entre le nombre d'Arg et de Trp (qui est un résidu essentiel de par ses qualités hydrophobes et de localisation interfaciale comme nous avons pu le montrer).

Une partie de ce travail a fait l'objet d'une publication (*Juillet 2014, BBA Biomembranes, en révision*) : The role of tryptophans on the cellular uptake and membrane interaction of arginine-rich cell penetrating peptides, M.L. Jobin, M. Blanchet, S. Chaignepain, C. Manigand, F. Burlina, S. Sagan, I. D. Alves.





# CONCLUSIONS GENERALES





## **RWI6 vs RW9 & RX9**

Les CPPs étudiés au cours de cette thèse sont très similaires d'un point de vue moléculaire, ils dérivent tous les deux de la pénétratine par des études structure/activité. Ces deux peptides sont amphipatiques secondaires, ils ne sont composés que de deux résidus (Arg et Trp) et possèdent une charge nette positive. RWI6 est la version plus longue et aussi l'image miroir de RW9 à partir du centre vers les deux extrémités N- et C-terminale du peptide. Cependant, ils possèdent des propriétés cellulaires et d'interactions membranaires assez différentes.

Le peptide RWI6 dispose de propriétés antimicrobiennes fortes avec des MIC de l'ordre du micromolaire (10 $\mu$ M avec un effet lytique sur *E. Coli*). De plus, il réduit la croissance de cellules tumorales.

Le peptide RW9 a montré de faibles propriétés antimicrobiennes (25 $\mu$ M avec un effet bactériostatique jusqu'à 50 $\mu$ M sur *E. Coli*) et a montré une faible activité anti-tumorale. L'étude sur les analogues de RW9 (RX9) a démontré que leur internalisation dépend du nombre et de la position des Trp tandis que l'interaction peptide/lipide est très similaire pour chaque analogue et dépend du nombre d'Arg.

Ces deux CPPs ont révélé des interactions favorisées avec les lipides anioniques et cela n'est pas surprenant compte tenu du nombre de charges positives qu'ils portent.

Cependant, l'analyse par spectroscopie de fluorescence du Trp et des études de modélisation nous ont permis de montrer que ces deux peptides n'ont pas d'activités similaires en présence de lipides zwitterioniques. Par exemple, nous avons observé que RWI6 s'insère dans les membranes zwitterioniques avec la même affinité et la même profondeur d'insertion que dans les membranes anioniques. Il s'insère à une profondeur d'environ 13 Å du centre de la bicouche, à l'interface entre les têtes polaires et le cœur hydrophobe des membranes. Au contraire, RW9 et les analogues RX9 s'insèrent dans les liposomes anioniques à environ 10 Å du centre de la bicouche, donc plus profondément, juste en dessous des têtes polaires lipidiques. Dans le cas des liposomes zwitterioniques, ces peptides restent à la surface de la membrane et ne s'insèrent pas dans la bicouche. L'affinité de RW9 et des analogues RX9 mesurée est aussi plus élevée pour les lipides anioniques.

Les spectres de CD pour les analogues RX9 se sont révélés fortement modifiés par les signaux des interactions  $\pi$ - $\pi$  contrairement aux signaux CD du peptide RWI6 sur lesquels très peu de déviation du signal a été remarquée.

Cette différence de signal de CD révèle un environnement des Trp nettement différent dans les deux cas et pour tous les types de membranes ou en solution.

Il faut noter que, d'une façon générale, la proportion de charges positives sur les analogues RX9 et RW9 est plus élevée que pour le peptide RWI6 (67% pour RW9 et les RX9 contre 63% pour RWI6). Cette différence doit conférer aux RX9 et RW9, une affinité plus forte pour les membranes chargées négativement, favoriser le déclenchement de leur insertion plus profonde dans la membrane et donc leur internalisation dans les liposomes anioniques ou les maintenir à la surface des membranes zwitterioniques. Pour RWI6, la proportion de résidus hydrophobes est plus élevée et cela entraîne le peptide à s'insérer de la même manière dans les deux types de membranes (zwitterioniques et anioniques) en se localisant à l'interface entre la région polaire et la région hydrophobe de la bicouche. Cette propriété d'insertion au niveau des têtes polaires lipidiques est à l'origine de perturbations membranaires et pourraient expliquer la différence de propriétés antimicrobiennes entre les peptides.

Les CPPs riches en Arg ont été amplement étudiés, ainsi que le rôle des résidus Arg dans ces peptides, ce qui n'est pas du tout le cas des Trp. Les études réalisées au cours de cette thèse apportent des informations importantes sur le rôle des Trp pour l'internalisation de ces peptides. Nous avons ainsi pu montrer que les propriétés interfaciales des résidus hydrophobes sont essentielles pour permettre au peptide un positionnement plus flexible au niveau de la membrane et donc plus réversible dans la membrane. De plus, nous avons constaté qu'un CPP comme RWI6 possède une activité antimicrobienne et anticancéreuse et que cela peut-être corrélé à son interaction favorisée avec les lipides anioniques.

L'application des résultats obtenus dans cette étude pour les résidus hydrophobes (faible hydrophobicité, propriétés interfaciales) pourra être appliquée pour l'optimisation des séquences peptidiques notamment pour améliorer l'internalisation cellulaire des CPPs. Des études de spécificité pour certaines lignées cellulaires, et notamment sur des lignées cancéreuses pourraient être envisagées à la suite de ce travail dans le but d'optimiser la spécificité des CPPs pour les cellules tumorales. La comparaison avec d'autres CPPs composés de résidus cationiques et hydrophobes différents pourrait permettre de valider nos résultats.

Grâce à une amélioration de la spécificité des CPPs pour certaines cellules, ceux-ci pourraient remplir à la fois un rôle de ciblage, habituellement réalisé par des molécules telles que des anticorps ou spécifiques à certains récepteurs membranaires, ainsi que leur rôle d'internalisation cellulaire. En réalisant le couplage de molécules thérapeutiques ou diagnostiques à ces nouveaux peptides vecteurs, cela permettrait de diminuer les risques d'effets secondaires grâce à la suppression d'une imposante molécule de ciblage mais aussi de diminuer les coûts de production de ces molécules aux propriétés de libération intracellulaire.

Enfin, un protocole basé sur la fluorescence intrinsèque des résidus Trp de certains peptides vecteurs a été développé au cours de cette thèse. L'objectif était de développer un protocole simple et surtout ne nécessitant pas de marquage des CPPs, ce qui peut souvent modifier les propriétés physico-chimiques des CPPs (interaction avec la membrane, internalisation et même cytotoxicité). Ce protocole est basé sur l'inhibition de fluorescence des Trp par l'acrylamide qui est soit encapsulé dans les liposomes soit rajouté à l'extérieur des vésicules. Les premiers résultats obtenus avec RW9 apparaissent très encourageants et sont en accord avec d'autres données décrites dans la littérature. Cependant, il subsiste encore des questions à éclaircir et des contrôles à réaliser afin de valider cette méthode comme applicable à la quantification d'internalisation dans les liposomes de tout CPPs contenant des Trp, et des expériences sont en cours afin d'y aboutir.



# MATERIELS & METHODES

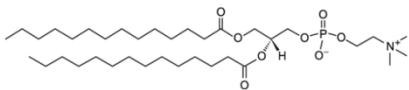
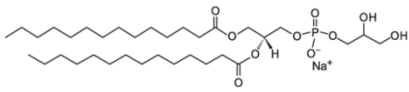
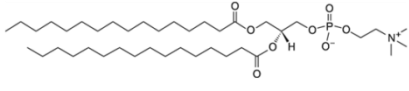
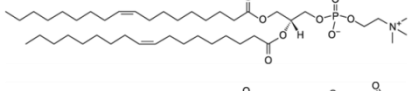
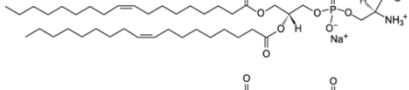
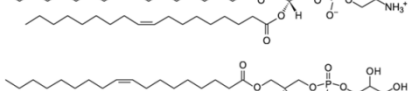

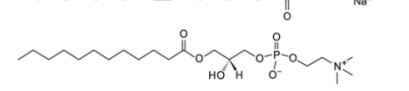
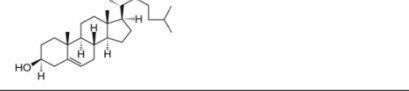
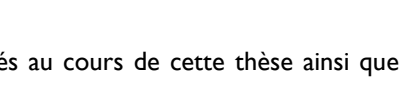


## I. Matériels

### I. I. Lipides et détergents

Les phospholipides suivants : DMPC, DMPG, DPPC, DOPC, DOPG, DOPE, DOPS, POPG, EggPC, Cholestérol proviennent de Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL).

Le DPC-d<sub>38</sub> nous a été donné par Gilmar Salgado (IECB, UMR 6849, Université de Bordeaux).

<u>Lipides</u>			<u>T<sub>m</sub> (°C)</u>
DMPC	14:0/14:0		23
DMPG	14:0/14:0		23
DPPC	16:0/16:0		41
DOPC	18:1/18:1		-20
DOPS	18:1/18:1		-11
DOPE	18:1/18:1		-16
DOPG	18:1/18:1		-18
POPG	18:1/18:1		-2
DPC	12:0/0:0		
Cholestérol			

**Figure 72.** Les différents lipides utilisés au cours de cette thèse ainsi que leur température de transition de phase (T<sub>m</sub>).

## I. 2. Peptides

La synthèse et la purification du peptide Biot(O<sub>2</sub>)-Apa-RW16-NH<sub>2</sub> (RRWRRWWRRWWRRWRR) a été réalisée par Rodrigue Marquant (LBM, UMR 7613, Université Pierre et Marie Curie).

## II. Méthodes

### II. 1. Compositions des tampons

Selon les techniques utilisées différents tampons décrits ci-dessous ont été préparés :

Tampon Tris 10 mM (DSC, ITC, PWR, Cryo-MET, Fluorescence) (pH 7,4)

10 mM Tris

150 mM NaCl

2 mM EGTA

Tampon phosphate 10 mM (CD, DLS) (pH 7,4)

Tampon phosphate 10 mM (RMN) (pH 5,5) dans H<sub>2</sub>O/D<sub>2</sub>O 9:1 v:v

Tampon Calcéine (pH7.4)

70 mM calcéine

70 mM NaCl

10 mM Tris

2 mM EGTA

Tampon d'élution pour la colonne de gel filtration calcéine (pH 7.4)

10 mM Tris

140 mM NaCl

2 mM EGTA



Tampon H (Calcéine/acrylamide) (pH 7.4)

10 mM Tris

100 mM NaCl

2 mM EGTA

50 mM Calcéine

50 mM Acrylamide

Tampon E d'élution pour la colonne de gel filtration calcéine/acrylamide (pH 7.4)

10 mM Tris

200 mM NaCl

2 mM EGTA

Quantification de l'internalisation des peptides:

Tampon A : 50 mM Tris HCl ; 0,1 mg/mL BSA ; pH = 7,5

Tampon B : 50 mM Tris HCl ; 0,1 mg/mL BSA ; 0,1 % SDS ; pH = 7,5

Tampon C : 50 mM Tris HCl ; 0,1 mg/mL BSA ; 1 M NaCl ; pH = 7,5

Pronase : 100 mM Tris HCl ; 0.5 mg/mL pronase ; pH = 7,5

Solution de lyse : 0.3% Triton X-100 ; 1 M NaCl

## II. 2. Synthèse chimique des RX9

Nous avons choisi de réaliser la synthèse des peptides dérivés RX9 par la technique de synthèse sur support solide (SPPS) et utilisant la stratégie Fmoc sur une résine de type Rink amide (taux de substitution 0.69 mmol). Les acides aminés suivants ont été utilisés: Fmoc-Arg(PBF)-OH, Fmoc-Trp, Fmoc-(<sup>2</sup>H)-Gly-OH, Fmoc-(<sup>2</sup>D)-Gly-OH ainsi que de la biotine sulfone (Biot(O<sub>2</sub>)).

La biotine sulfone a été préparée en dissolvant 10 mmoles de biotine dans 10 mL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> à 30 % dans l'eau. Le mélange a été laissé remué pendant une nuit à température ambiante et un précipité est apparu. Le précipité est filtré, lavé avec de l'éther diéthylique et séché sous vide. La pureté et la bonne réaction a été vérifié par <sup>1</sup>H-RMN et le rendement de la réaction est de 99%.

Nous avons réalisé la synthèse des 14 peptides dont les séquences peptidiques sont indiquées dans le Tableau 19.

La synthèse des peptides a été réalisée sur un synthétiseur automatique (Applied Biosystems Model A433) pour les 9 résidus qui se trouvent en partie C-Terminale. L'ajout des 4 Gly et de la biotine a été réalisé manuellement pour les 14 peptides.

	Séquences en AA des peptides	MW (Da)
<b>RFFF9</b>	Biotine(O <sub>2</sub> )-[ <sup>1</sup> H]G <sub>4</sub> -RRFFRRFRR-NH <sub>2</sub>	1882
	Biotine(O <sub>2</sub> )-[ <sup>2</sup> H]G <sub>4</sub> -RRFFRRFRR-NH <sub>2</sub>	1890
<b>RFFW9</b>	Biotine(O <sub>2</sub> )-[ <sup>1</sup> H]G <sub>4</sub> -RRFFRRWRR-NH <sub>2</sub>	1921
	Biotine(O <sub>2</sub> )-[ <sup>2</sup> H]G <sub>4</sub> -RRFFRRWRR-NH <sub>2</sub>	1929
<b>RWFF9</b>	Biotine(O <sub>2</sub> )-[ <sup>1</sup> H]G <sub>4</sub> -RRWFRRFRR-NH <sub>2</sub>	1921
	Biotine(O <sub>2</sub> )-[ <sup>2</sup> H]G <sub>4</sub> -RRWFRRFRR-NH <sub>2</sub>	1929
<b>RFWF9</b>	Biotine(O <sub>2</sub> )-[ <sup>1</sup> H]G <sub>4</sub> -RRFWRRFRR-NH <sub>2</sub>	1921
	Biotine(O <sub>2</sub> )-[ <sup>2</sup> H]G <sub>4</sub> -RRFWRRFRR-NH <sub>2</sub>	1929
<b>RFWW9</b>	Biotine(O <sub>2</sub> )-[ <sup>1</sup> H]G <sub>4</sub> -RRFWRRWRR-NH <sub>2</sub>	1960
	Biotine(O <sub>2</sub> )-[ <sup>2</sup> H]G <sub>4</sub> -RRFWRRWRR-NH <sub>2</sub>	1968
<b>RWWF9</b>	Biotine(O <sub>2</sub> )-[ <sup>1</sup> H]G <sub>4</sub> -RRWWRRFRR-NH <sub>2</sub>	1960
	Biotine(O <sub>2</sub> )-[ <sup>2</sup> H]G <sub>4</sub> -RRWWRRFRR-NH <sub>2</sub>	1968
<b>RWFW9</b>	Biotine(O <sub>2</sub> )-[ <sup>1</sup> H]G <sub>4</sub> -RRWFRRWRR-NH <sub>2</sub>	1960
	Biotine(O <sub>2</sub> )-[ <sup>2</sup> H]G <sub>4</sub> -RRWFRRWRR-NH <sub>2</sub>	1968

**Tableau 19.** Séquences des 14 peptides synthétisés.

La synthèse manuelle a été réalisée de la façon suivante:

La résine est placée dans une seringue avec un fritté et l'on ajoute du DMF pour la laisser gonfler 30 minutes.

Déprotection : - Laisser agir la pipéridine 20% (5 mL) pendant 5 minutes

- Filtrer

- Rincer une fois au DMF (8mL)

- Filtrer

- Ajouter de la pipéridine (5mL) pendant 15 minutes

- Rincer quatre fois au DMF (8mL)

Test Kaiser : - sur quelques billes ajouter 2 gouttes de pyridine, d'éthanol saturé en phénol et de nynydrine

- chauffer à 90°C pendant une minute:
  - ✓ si les billes sont colorées : la déprotection est efficace
  - ✓ si les billes ne sont pas colorées : l'amine est toujours présente et il n'y a pas eu de déprotection

- Couplage :
- Préparer un cocktail avec 3 éq d'AA-Fmoc, 3 éq. d'HOBt, 3 éq. de PyBOP dans 4 mL de DMF
  - Ajouter ce mélange à la résine
  - Ajouter 10 éq. de DiEA à la résine
  - Laisser agiter pendant 1 heure
  - Rincer quatre fois au DMF (8mL)

Test Kaiser : si les billes sont transparentes, le couplage est efficace

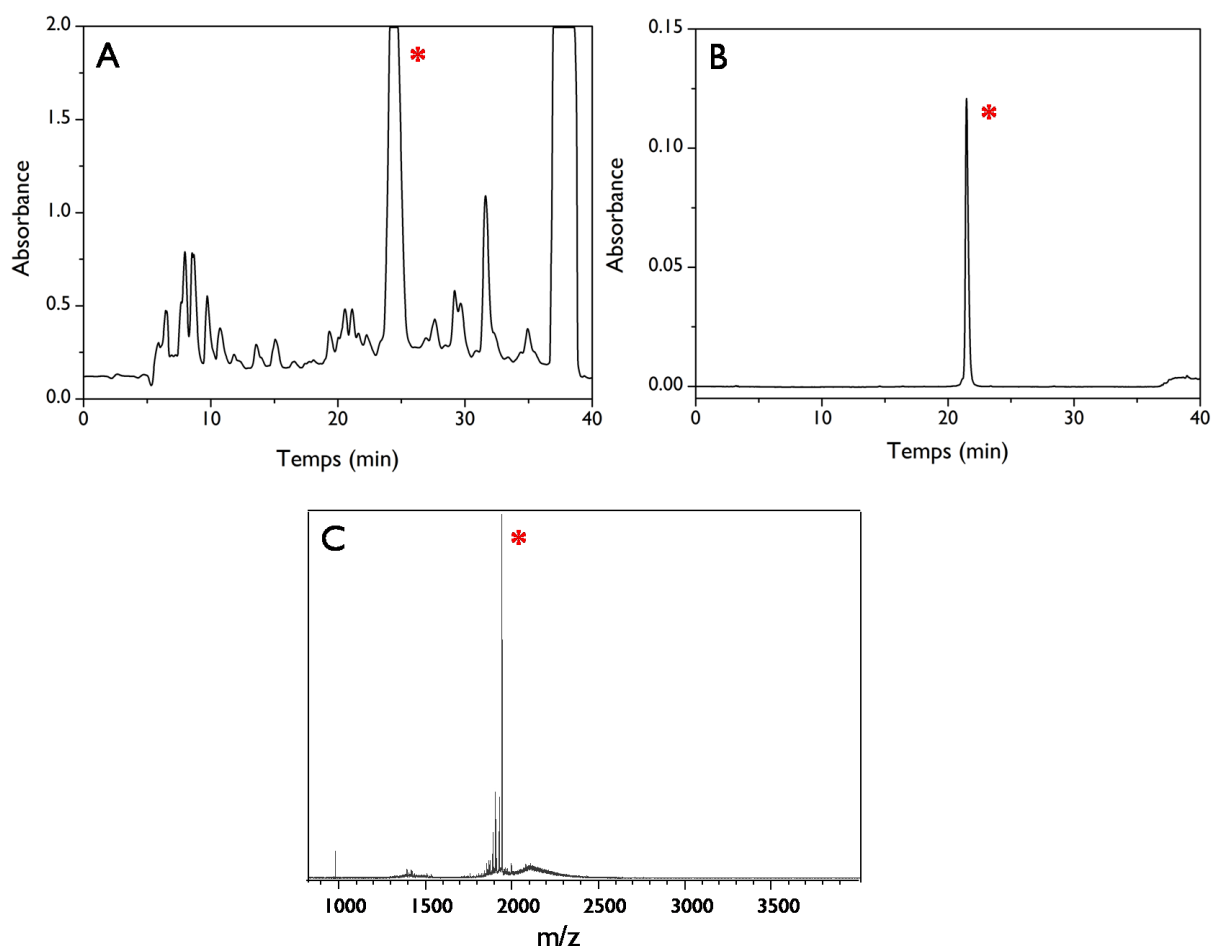
Ce protocole de couplage/déprotection a été répété pour les 4 Gly.

Pour le couplage de la biotine, les conditions expérimentales sont les mêmes et les nombres d'équivalents de biotine et d'activateur sont les mêmes.

Le clivage de la résine s'est effectué de la manière suivante:

- Clivage :
- Laver la résine au DCM
  - Ajouter le cocktail de clivage suivant : 95% de TFA, 2.5% de TIPS, 2.5% d'eau
  - Laisser agiter pendant 3 heures
  - Filtrer et récupérer le filtrat dans un ballon de 50 mL
  - Laver la résine avec du TFA (~1-2 mL)
  - Evaporer le solvant avec un évaporateur rotatif jusqu'à obtenir un culot visqueux (non sec)
  - Faire précipiter le culot en ajoutant de l'éther froid (plus il y a de peptide, plus il y a de précipité)
  - Centrifuger le mélange (4500 rpm, 10 min, 4°C) et récupérer le culot (peptide)

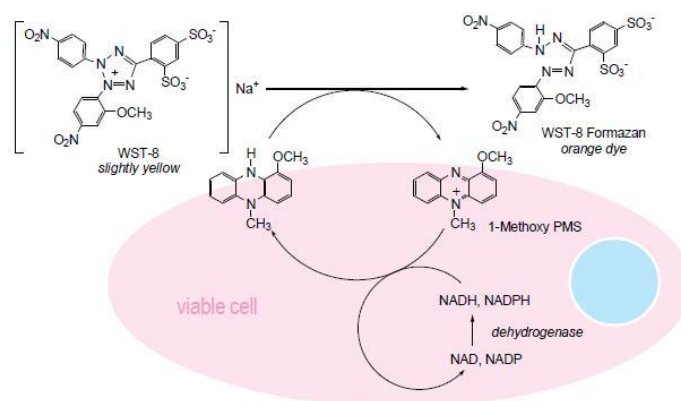
La bonne synthèse des peptides a été vérifiée par spectrométrie de masse MALDI-TOF et leur purification a été réalisée par chromatographie HPLC avec un gradient  $\text{CH}_3\text{CN}$  (TFA 0,08%)/ $\text{H}_2\text{O}$  (1 % TFA) de départ 85/15 (v/v) et final de 60/40 (v/v) (pour les peptides RFFW9, RFWW9 et RFWF9), 75/25 (v/v) (RFFF9, RWFF9, RFWF9) et 70/30 (v/v) (RWWF9) (Figure 73).



**Figure 73.** (A) Chromatogramme obtenu par HPLC semi-préparative pour le peptide RFWF9 avant sa purification ; (B) Chromatogramme obtenu par HPLC analytique pour le peptide RFWF9 après sa purification ; (C) Spectre de masse du peptide RFWF9 après sa purification par HPLC avec le gradient  $\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{CN}$  85/15 au départ puis 75/25 au final. Dans les trois cas, l'étoile indique le pic correspondant au peptide RFWF9 (MW = 1921 Da).

### II. 3. Tests de cytotoxicité

Les tests de cytotoxicité sont évalués à l'aide du kit « Cell Counting Kit-8 » (Dojindo). Le comptage des cellules viables repose sur un test colorimétrique utilisant l'activité des deshydrogénases cellulaires (Figure 74). Le réactif du kit CCK-8 contient un sel de tétrazolium, le WST-8 et un transporteur d'électron intermédiaire, le 1-méthoxy PMS qui va se localiser au niveau des membranes cellulaires. Dans les cellules vivantes, le NAD(P)H formé par les deshydrogénases pourra réduire le 1-méthoxy PMS qui réduira à son tour le WST-8 en formazan qui possède une bande d'absorption à 450 nm.



**Figure 74.** Principe du test de cytotoxicité CCK-8. Figure tirée de <http://www.dojindo.com/store/p/456-Cell-Counting-Kit-8.html>

La veille, 4 000 cellules (CH0-K1) par puits (soit 100  $\mu$ L d'une suspension de 40 000 cellules/mL dans du DMEM + 10% SVF) sontensemencées dans une plaque 96 puits. Après 24 h, les cellules sont rincées et les surnageants sont aspirés et remplacés par 100  $\mu$ L de DMEM. 100  $\mu$ L des solutions de peptide à tester à la concentration voulue dans du DMEM sont ajoutés par puits en triplicat et laissés incuber à 37 °C pendant 1h. Le contrôle de non-toxicité correspond à un puits sans cellule et le contrôle de toxicité maximale correspond à l'ajout de 10  $\mu$ L de Triton X-100 0.3 %. A la fin de l'incubation, les surnageants sont aspirés et remplacés par 100  $\mu$ L de CCK8 10% dans du DMEM. L'absorbance à 450 nm est lue au lecteur de plaque après 1h30 d'incubation à 37 °C. Le pourcentage de viabilité cellulaire est calculé en utilisant la formule suivante :

$$\% \text{ viabilité cellulaire} = \frac{A_{\text{peptide}} - A_{\text{toxique}}}{A_{\text{non toxique}} - A_{\text{toxique}}} \quad (I)$$

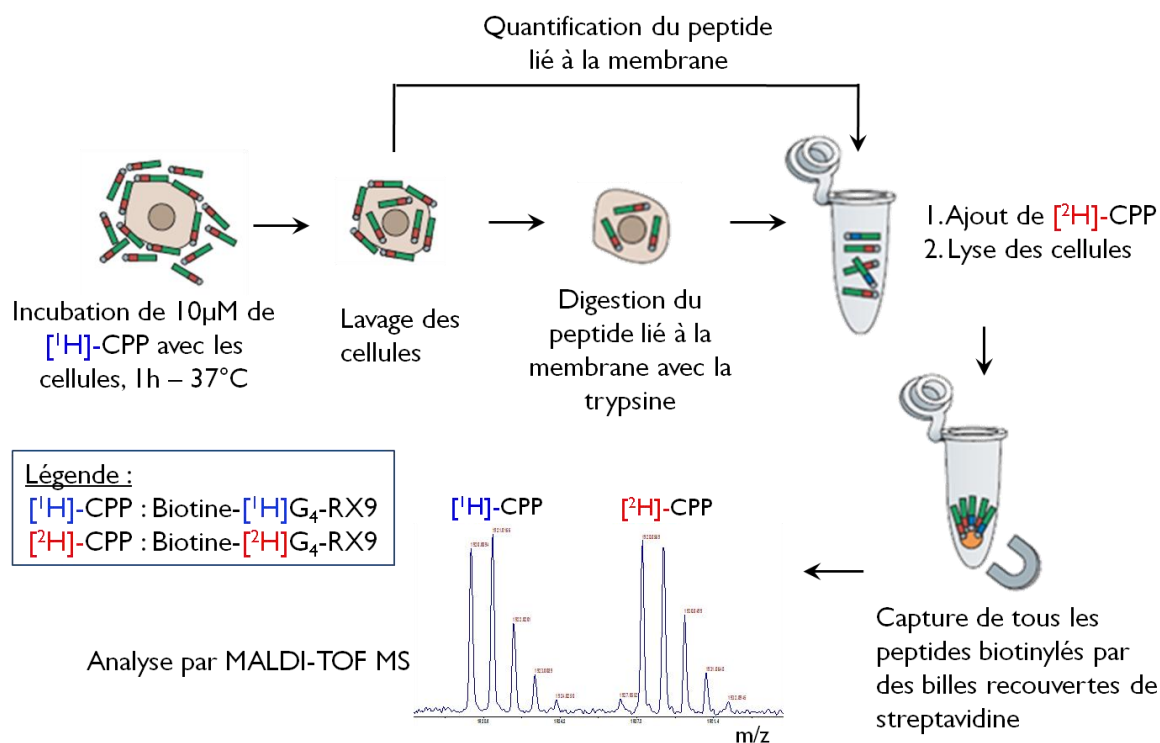
où  $A_{\text{peptide}}$ ,  $A_{\text{non toxique}}$  et  $A_{\text{toxique}}$  représentent les moyennes des absorbances à 450 nm pour les puits correspondant au peptide à tester, au contrôle négatif et au contrôle positif respectivement. L'expérience a été répétée trois fois.

## II. 4. Quantification de l'internalisation dans les cellules

Le protocole de quantification utilisé, a été développé par Burlina et collaborateurs et repose sur la spectrométrie de masse MALDI-TOF [129]. Cette méthode présente de nombreux avantages comparés aux méthodes de quantification actuelles : la détection du peptide est directe, le peptide étudié n'est pas fortement modifié par la présence d'une sonde, la quantification peut porter sur plusieurs peptides simultanément, sur le peptide vecteur lui-même ou sur une cargaison peptidique, et la présence de catabolites potentiels peut également être détectée.

La plus grande limitation de la méthode réside dans le fait que la localisation cellulaire des peptides internalisés (cytosol, endosomes, noyau...) ne peut pas être déterminée, ce qui ne permet pas d'apporter d'arguments en faveur d'un mécanisme d'internalisation en particulier. La spectrométrie de masse n'est pas une méthode quantitative en soi et la quantification de la quantité de peptide internalisé repose donc sur l'utilisation d'un étalon interne. Cet étalon correspond à la même séquence d'acides aminés que le peptide étudié, garantissant ainsi une ionisation identique en spectrométrie de masse (Figure 75).

Les deux peptides, internalisé et étalon, possèdent tous les deux une étiquette constituée de quatre résidus Gly. Sur le peptide étalon, ces résidus sont bi-deutérés ( $[^2\text{H}]G_4\text{-CPP}$ ) alors que sur le peptide internalisé, ces résidus sont non deutérés ( $[^1\text{H}]G_4\text{-CPP}$ ). Ainsi, sur le spectre de masse obtenu, les massifs isotopiques correspondant aux deux peptides seront séparés par huit unités de masse. Le rapport des aires des deux massifs conduira à la quantité de peptide internalisé. De plus, les peptides internalisé et étalon portent tous les deux une biotine à leur extrémité N-terminale, ce qui permet leur capture grâce à la forte interaction biotine/streptavidine.



**Figure 75.** Schéma représentant les différentes étapes du protocole de quantification de peptide internalisé et membranaire par analyse MALDI-TOF MS.

La veille,  $5.10^5$  cellules CHO-K1 par puit (2 mL d'une suspension de  $2,5.10^5$  cellules/mL dans du DMEM + 10% SVF) sont ensemencées dans une plaque 12 puits.

Après 24 h, les surnageants sont aspirés et les cellules sont lavées deux fois avec 1 mL de HBSS en prenant soin de ne pas détacher les cellules. On ajoute du peptide à une concentration de  $10\mu\text{M}$  dans 1 mL de DMEM par puit et on laisse incubé 1h à  $37^\circ\text{C}$  ou  $4^\circ\text{C}$ . A la fin de l'incubation, les cellules sont lavées afin d'éliminer le peptide en solution ou lié faiblement aux cellules. Les cellules sont lavées trois fois avec 1 mL de HBSS.

Cependant, une certaine quantité de peptide peut rester associé à la membrane cellulaire par des interactions fortes. 500  $\mu\text{L}$  de solution de Trypsine/EDTA (ou de pronase pour les expériences à  $4^\circ\text{C}$ ) sont alors ajoutés et laissés incubés 5 minutes à  $37^\circ\text{C}$  ou  $4^\circ\text{C}$ , la plaque est placée directement à  $4^\circ\text{C}$ . Celle-ci permet de détacher les cellules adhérentes mais surtout de dégrader le peptide encore associé aux membranes. La trypsine peut être remplacée par d'autres protéases, par exemple, la pronase, un mélange de protéases, peut être utilisée pour réaliser la même expérience à  $4^\circ\text{C}$ .

La trypsine est inhibée par l'ajout de 100  $\mu$ L d'inhibiteur de trypsine (STI 5mg/mL) et la pronase est inhibée par l'addition de 100  $\mu$ L d'inhibiteur de protéase Complete Mint (Roche), et 100  $\mu$ L de BSA 1mg/mL sont ajoutés.

Le contenu de chaque puits est transféré dans un microtube de 1,5 mL. Les puits sont lavés avec 500  $\mu$ L de Tris HCl 50 mM, pH = 7,4 pour récupérer les cellules éventuellement restées dans les puits et le contenu de chaque puit est transféré dans le microtube correspondant. Les tubes sont centrifugés pendant 5 minutes à 640 g (3 000 rpm pour une centrifugeuse Sanyo MSE Micro Centaur). Les surnageants sont éliminés et les culots sont resuspendus dans 1 mL de tampon A. Les tubes sont à nouveau centrifugés 5 minutes à 640 g et les surnageants éliminés. 150  $\mu$ L de solution de lyse contenant la quantité voulue de peptide étalon ( $[^2\text{H}]$ G<sub>4</sub>-CPP) sont ajoutés aux culots et les tubes sont immédiatement placés à 100 °C pendant 15 min, un précipité blanc apparaît. Cette étape de chauffage est cruciale, car elle permet de dénaturer les protéases cellulaires. De plus, elle permet d'exposer les peptides internalisés et étalons aux composants du lysat dans les mêmes conditions, permettant ainsi une récupération identique par les billes magnétiques.

Les lysats cellulaires sont refroidis à 4 °C et centrifugés pendant 5 min à 9204 g (soit 13 000 rpm pour une centrifugeuse Sanyo MSE Micro Centaur). Les surnageants sont transférés dans des microtubes de 1,5 mL et les précipités sont lavés avec 850  $\mu$ L de tampon A puis centrifugés à nouveau pendant 5 min à 9204 g. Les surnageants sont récupérés et ajoutés aux premiers. 20  $\mu$ L de suspension de billes magnétiques lavées (les billes magnétiques sont préalablement lavées 3 fois avec 20  $\mu$ L de tampon A) sont ajoutés dans les tubes et laissés pendant 1h sous légère agitation. Les tubes sont alors placés sur un portoir aimanté afin de concentrer les billes magnétiques qui sont lavées successivement par 200  $\mu$ L de tampon A (2 fois), 200  $\mu$ L de tampon B (2 fois), 200  $\mu$ L de tampon C (2 fois), 200  $\mu$ L, puis 100  $\mu$ L et enfin 50  $\mu$ L d'eau. Les billes sont ensuite saturées par l'ajout de 50  $\mu$ L d'une solution de biotine à 8  $\mu$ M. Les billes sont finalement lavées par 50  $\mu$ L d'un mélange H<sub>2</sub>O/MeCN (1:1). Enfin, les peptides sont élués des billes magnétiques par l'ajout de 3  $\mu$ L de matrice HCCA (solution saturée de HCCA dans H<sub>2</sub>O/MeCN (1:1 v/v) (0,1 % TFA) pendant 5 à 10 minutes. Après immobilisation sur l'aimant, 1  $\mu$ L du surnageant est prélevé et déposé sur la plaque MALDI. Les échantillons sont ensuite analysés par spectrométrie de masse MALDI-TOF en mode réflecteur positif sur un spectromètre de masse Voyager DEPro (Applied Biosystems).



Sur le spectre de masse, le rapport des aires des massifs correspondant aux peptides internalisés et étalon permet d'accéder à la quantité de peptide internalisé. Ces expériences ont été réalisées 3 fois en triplicat.

## II. 5. Quantification de peptide lié à la membrane

La présence de peptide lié fortement à la membrane est probablement la cause d'une très forte surestimation de la quantité de peptide internalisé, voire de faux positifs dans certaines études. C'est pourquoi l'étape de digestion du peptide extracellulaire est cruciale. Néanmoins, il peut être intéressant d'estimer cette quantité de peptide « membranaire ». Dans cette optique le protocole présenté ci-dessus peut être modifié très simplement.

A la fin de l'incubation du peptide avec les cellules à 37 °C ou 4 °C les cellules sont lavées trois fois avec 1 mL de HBSS. Après les étapes de lavage cellulaire, 150 µL de solution de lyse contenant le peptide étalon sont ajoutés directement dans les puits et la plaque 12 puits est placée pendant 15 minutes dans l'eau bouillante. Le contenu des puits est alors transféré dans des microtubes, placés dans la glace et centrifugés pendant 5 minutes à 7 080 g. Les surnageants sont récupérés et les précipités sont lavés avec 850 µL de tampon A et re-centrifugés à 7 080 g. Les surnageants sont rassemblés avec ceux récupérés à la première centrifugation. 20 µL de suspension de billes magnétiques sont ajoutés par tube et laissés pendant 1 heure sous légère agitation. La suite du protocole est identique à celle décrite précédemment.

On a ainsi accès au peptide internalisé et associé à la membrane. Ce dernier est présent en quantité environ cent fois supérieur au peptide internalisé. Le peptide détecté correspond donc au peptide associé à la membrane en quasi-totalité.

### **Avantages**

- ✓ Permet de discriminer les peptides membranaires des peptides internalisés
- ✓ N'utilise pas de sondes qui modifient le comportement des CPPs

### **Inconvénients**

- ✓ Ne permet pas de détecter la localisation du peptide intracellulaire

### **Sensibilité**

- ✓ Détecte des quantités de peptides de l'ordre de la pmole

## II. 6. Préparation des vésicules

Les liposomes ont été préparés en dissolvant la quantité nécessaire de phospholipides pour obtenir la concentration finale voulue, dans du chloroforme/méthanol (2:1 v:v) pour s'assurer de la miscibilité complète des composants. Un film lipidique a été formé en évaporant le solvant sous flux d'azote puis le film est placé sous vide pendant 3h.

### II.6.1. Vésicules multi-lamellaires (MLVs)

Pour former des MLVs, les films lipidiques sont hydratés avec du tampon Tris 10 mM pH 7.4 ou Phosphate 10 mM pH 7.4 selon les expériences puis vortexé.

### II.6.2. Vésicules Grandes Unilamellaires (LUVs)

Pour former des LUVs, 5 cycles de congélation à l'azote liquide et décongélation ( $T^\circ > T_m$  des lipides) ont été effectués sur une solution de MLVs. La solution est ensuite passée à travers un mini-extrudeur équipé d'un filtre de polycarbonate de taille de pores de 0.1  $\mu\text{m}$  (Avanti, Alabaster, AL). L'analyse de la suspension obtenue après extrusion par DLS confirme une distribution d'objets de rayon hydrodynamique de 100 nm.

**Avantages**

- ✓ Leur facilité de préparation et leur taille permet leur utilisation pour de nombreuses techniques spectroscopiques

**Inconvénients**

- ✓ Leur taille imite mal la courbure membranaire des cellules

### II.6.3. Petites Vésicules Unilamellaires (SUVs)

La formation de SUVs est réalisée à partir de la solution de MLVs, qui est sonifiée 4 à 5 fois à l'aide d'un sonicateur sur une durée de 10 minutes, puissance 40W, par impulsions de 3 secondes, en laissant reposer et bien refroidir entre les différentes sonifications. Pour assurer le refroidissement de la solution, celle-ci est plongée dans un b cher contenant de l'eau ainsi que des glaçons afin d'éviter tout effet de dégradation thermique. De plus, pour éliminer les éventuels débris de sonde, la dispersion est centrifugée. La fragmentation des MLVs permet la formation de très petits liposomes unilamellaires. Les solutions de SUVs sont ensuite conservées au réfrigérateur pour une durée de 3 à 4 jours et resonifi es avant chaque expérience.

#### Avantages

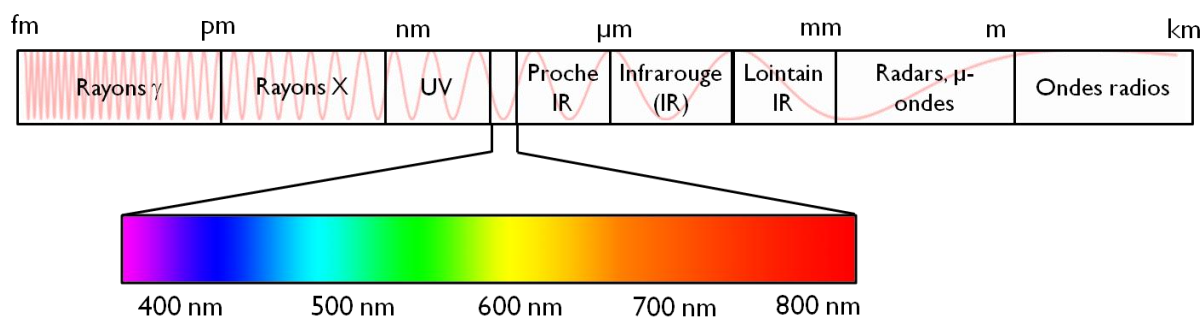
- ✓ Leur instabilité permet la formation de bicouche supportée

#### Inconvénients

- ✓ Leur petite taille imite mal la courbure membranaire des cellules
- ✓ La sonication peut entraîner l'apparition de particules de titanium dans la solution, défavorable à l'insertion de protéines membranaires dans la bicouche

## II. 7. Absorbance UV

La plupart des techniques biophysiques utilisées au cours de cette thèse reposent sur l'interaction onde électromagnétique - matière. Ainsi, la Figure 76 rappelle le spectre électromagnétique de la lumière en fonction des différents domaines spectraux.



**Figure 76.** Spectre électromagnétique de la lumière.

Les mesures de turbidité ont été réalisées en suivant l'absorbance à 436 nm dans une cellule en quartz de trajet optique 1 cm (QZS 422/4, Thuet).

Les concentrations de peptides ont été vérifiées avant chaque expérience par absorbance UV à 280 nm (absorbance du Trp) par une mesure UV/Visible avec une cellule TrayCell de trajet optique 1 mm (NanoDrop, Hellma).

## II. 8. Diffusion Dynamique de la Lumière (DLS)

Parfois appelée spectroscopie de corrélation de photons ou diffusion de la lumière quasi-élastique, la DLS mesure les mouvements Browniens et les relie à la taille des particules. Les mouvements Browniens sont les mouvements aléatoires des particules dû aux molécules de solvant qui les entoure. La DLS mesure donc la taille de particules suspendues dans un milieu liquide. La vitesse des mouvements est définie par une propriété connue comme le coefficient de diffusion translationnelle,  $D$ . Plus la particule est volumineuse, plus le mouvement Brownien sera lent. Dans ces expériences, le maintien d'une température stable est important car des changements de température peuvent affecter la viscosité de la solution et donc les mouvements des particules.

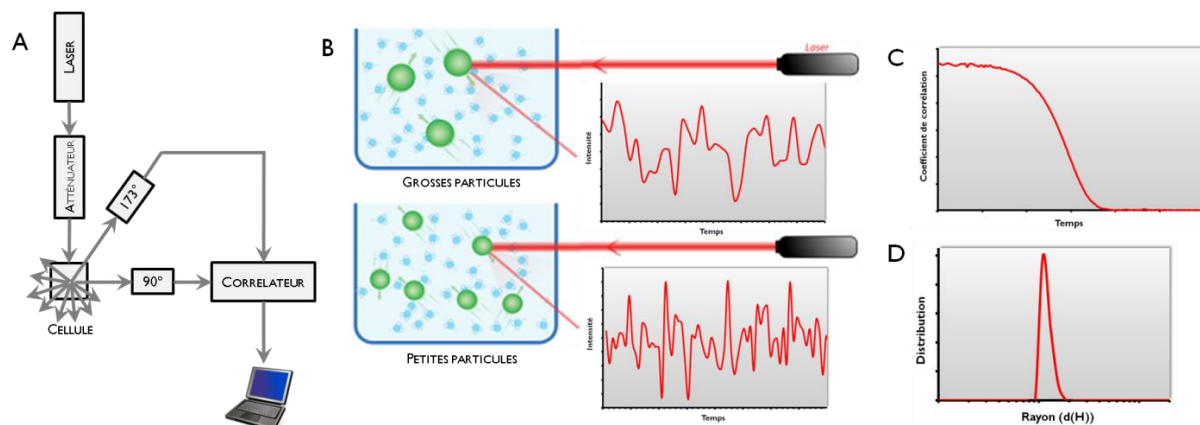
Le rayon hydrodynamique est calculé à partir du coefficient de diffusion  $D$  en utilisant l'équation de Stokes-Einstein:

$$d(H) = \frac{kT}{3\pi\eta D} \quad (2)$$

où  $d(H)$  représente le diamètre hydrodynamique des particules en solution,  $D$  le coefficient de diffusion translationnelle,  $k$  correspond à la constante de Boltzmann,  $T$  représente la température absolue et  $\eta$  la viscosité de la solution. La mesure de DLS consiste à mesurer la vitesse à laquelle les particules se déplacent. Cette mesure est réalisée en calculant la vitesse à laquelle l'intensité de la lumière diffusée fluctue. Cette vitesse dépend de la taille des particules, ainsi de petites particules vont entraîner l'intensité de la lumière à fluctuer plus rapidement que les grandes particules (Figure 77B).

A partir des fluctuations d'intensité de lumière, on obtient une fonction d'auto-corrélation de l'intensité de lumière diffusée. Grâce à l'utilisation de divers algorithmes, la taille des particules peut être obtenue à partir de la fonction d'auto-corrélation.

L'algorithme utilisé dans notre cas est la méthode CONTIN. Cette approche consiste à ajuster les courbes de corrélation (Figure 77C) avec de multiples exponentielles pour obtenir la distribution de taille des particules (Figure 77D). Les résultats apportent la taille et l'indice de polydispersité (pdi) qui informe sur la distribution de taille des particules. Un pdi inférieur à 0.3 indique que la taille des particules est homogène. Un pdi supérieur à 0.3 indique que la taille des particules varie au sein de l'échantillon.



**Figure 77. (A)** Montage de l'appareillage de DLS. Un laser fournit la source de lumière pour illuminer l'échantillon contenu dans la cellule. Pour des concentrations diluées, la plupart du faisceau laser passe à travers l'échantillon, mais une partie est diffusée par les particules de l'échantillon à tous les angles. Un détecteur est utilisé pour mesurer la lumière diffusée. La position de ce détecteur peut être de 173° ou de 90° en fonction de l'appareil utilisé. Un atténuateur est utilisé pour réduire l'intensité de lumière de la source et ainsi réduire l'intensité de diffusion. Le corrélateur compare l'intensité diffusée à des temps successifs pour dériver la vitesse à laquelle l'intensité varie et envoie ces informations à un ordinateur qui analyse ces données.

Pour les expériences de DLS, des LUVs de concentration 1 mg/mL et de taille 100 nm ont été préparées dans du tampon phosphate 10 mM (pH 7.4). La taille des LUVs seules a été mesurée puis le peptide a été ajouté à des concentrations croissantes (P/L variant de 1/100 à 1/100).

**Avantages**

- ✓ Permet de mesurer la taille et la distribution de taille des particules
- ✓ Rapide, bon marché

**Sensibilité**

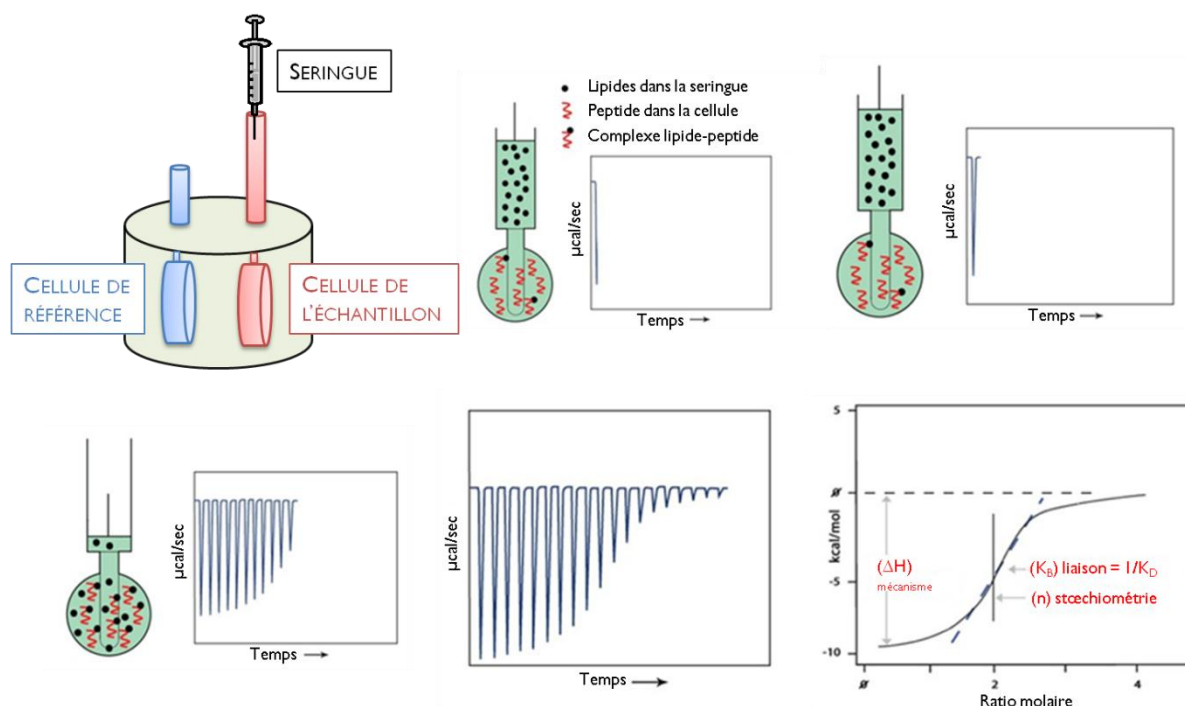
- ✓ Mesure des concentrations de l'ordre du nM

## II. 9. Calorimétrie

### II.9.1. Calorimétrie de Titration Isotherme (ITC)

L'ITC mesure une puissance différentielle entre une cellule référence et une cellule contenant l'échantillon pour maintenir une température de 0°C. Cette technique permet de mesurer des constantes de dissociation ( $K_D$ ), l'enthalpie et donc l'entropie de la réaction ainsi que la stœchiométrie ( $n$ ) (Figure 78).

Des LUVs de 100 nm ont été préparées à une concentration de 10 mg/mL dans du tampon Tris 10 mM et la concentration initiale de peptide est de 0.1 mM. Les solutions de tampon, de lipides et de peptides sont dégazées (605 mmHg pendant 10 minutes) juste avant les expériences d'ITC afin d'empêcher toute présence de bulle d'air qui nuirait à l'expérience. Un volume de 40  $\mu$ L de lipides est prélevé dans la seringue et 200  $\mu$ L de peptides sont déposés dans la cellule prévue pour l'échantillon. Les titrations ont été effectuées en ajoutant 2,5  $\mu$ L de lipides toutes les 10 minutes pour permettre l'équilibre complet de la réaction de liaison. L'analyse des données a été réalisée en utilisant Origin 7.0 MicroCal en appliquant le modèle de liaison "One set of sites" (1:1 interaction). Les expériences ont été réalisées à 20°C, 25°C, 30°C, 35°C et 40°C pour calculer la variation de capacité calorifique ( $\Delta C_p$ ).



**Figure 78.** Appareillage de l'ITC ainsi que les différentes étapes de titration peptide/lipide associées au signal observé.

#### Avantages

- ✓ Permet de mesurer les paramètres thermodynamiques liés à l'interaction P/L
- ✓ Ne nécessite pas de marqueur couplé aux molécules étudiées

#### Inconvénients

- ✓ Mise en place des expériences longues et délicates

#### Sensibilité

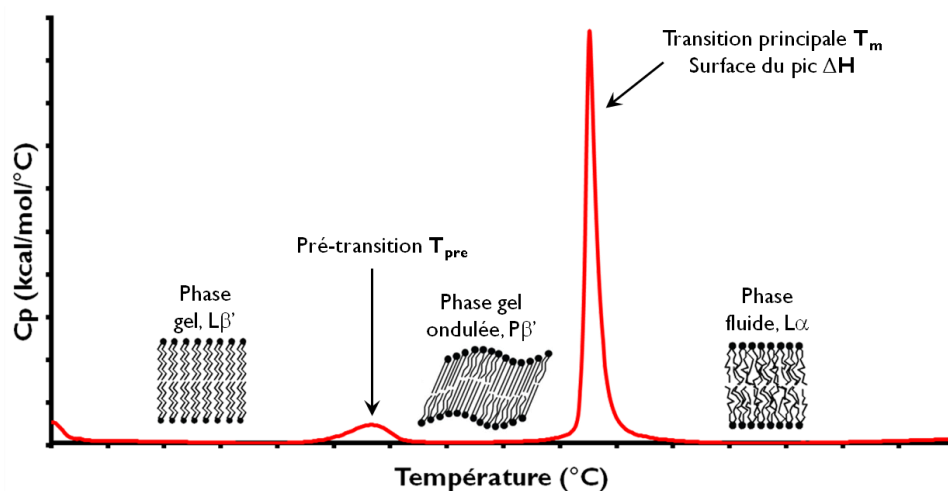
- ✓ Mesure des affinités de l'ordre de la µM

### II.9.2. Calorimétrie à Balayage Différentielle (DSC)

L'appareil de DSC est composé de deux cellules dont une cellule de référence dans laquelle le tampon utilisé pour l'expérience est déposé et une cellule pour l'échantillon. Lors d'une transition de phase endothermique ou exothermique, l'échantillon va absorber ou dégager de la chaleur. Les deux cellules sont soumises à un gradient linéaire de température.

La DSC mesure la différence de puissance (C<sub>p</sub>) fournie par l'appareil pour compenser la différence de température entre les deux cellules induite par les transitions de phases.

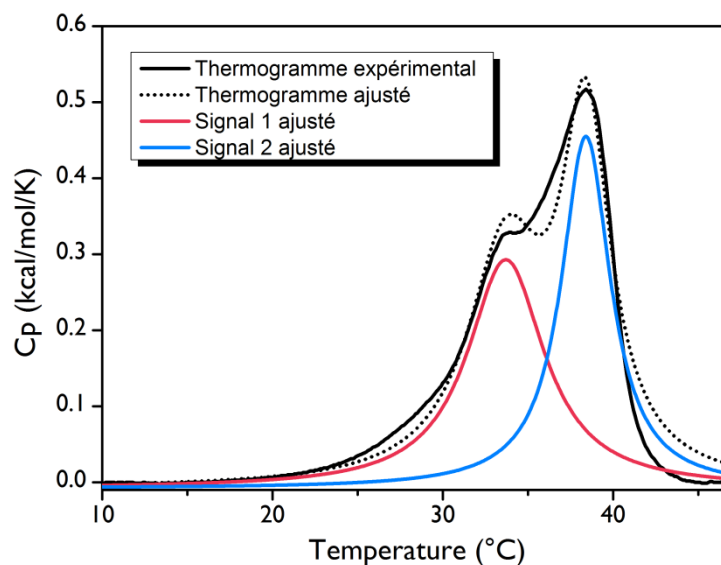
Comme cela a été décrit dans le Chapitre I, les lipides possèdent des transitions de phase qui varient en fonction de leur structure. La DSC permet d'obtenir les températures de phase de transition des lipides ainsi que les variations d'enthalpie de ces transitions ( $\Delta H$ ) en présence de peptides (Figure 79).



**Figure 79.** Thermogramme exothermique typique observé pour des transitions de phases lipidiques où les signaux de pré-transition ( $T_{pre}$ ) et de transition principale ( $T_m$ ) sont observés.

Des solutions de lipides ont été préparées à différentes concentrations en fonction de leur composition dans du tampon Tris 10 mM. Les concentrations des lipides sont les suivantes : 1 mg/mL pour DMPC et DMPG, 4 mg/mL pour DMPG/DPPC (60:40 mol:mol) et 6 mg/mL pour DMPC/Chol (95:5 mol:mol) et DMPG/Chol (95:5 mol:mol). Lorsqu'un recouvrement de plusieurs signaux de transition ou la séparation d'un signal de température de transition a été observé sur les thermogrammes expérimentaux, un ajustement de ces pics a été réalisé grâce à la fonction d'ajustement de pics multiples dans le logiciel Origin et en utilisant une fonction Lorentzienne pour chaque signal. L'aire du pic ajusté correspond à la variation d'enthalpie  $\Delta H$ , et la largeur à mi-hauteur représente le  $\Delta T_{1/2}$ . La variation d'entropie  $\Delta S$  a été calculée à partir de l'expression  $\Delta S = \Delta H/T$ .





**Figure 80.** Exemple d'ajustement du signal exothermique d'un thermogramme (DMPG/DPPC 60:40 mol:mol avec RW16 ratio P/L 1/25) lors de la séparation du signal de la température de transition principale.

Les scans ont été réalisés sur une gamme de température de 0°C à 40°C (ou 50°C pour certains mélanges de lipides) à une vitesse de 1°C/minute, 4 allers-retours ont été effectués pour permettre l'équilibration du système avec un intervalle de 10 minutes entre chaque aller-retour.

#### Avantages

- ✓ Permet d'observer les transitions de phase, calculer leur enthalpie de réaction et mesurer la coopérativité de la transition de phase

#### Inconvénients

- ✓ Nécessite des concentrations élevées de peptides et de lipides

#### Sensibilité

- ✓ Limité par le type de lipides : leur T<sub>m</sub> doit être supérieure à 0°C et ne permet pas de travailler sur des mélanges lipidiques complexes

## II. 10. Résonance Magnétique Nucléaire (RMN)

### II.10.1. RMN $^{31}\text{P}$

Les MLVs de DOPE ont été préparées à une concentration de 150 mg/mL dans du  $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$  (9:1 v:v) et l'acquisition RMN a été effectuée dans un rotor de 100  $\mu\text{L}$ .

Le peptide a été ajouté en poudre aux liposomes afin d'obtenir un ratio P/L de 1/100 puis ensuite vortexés pour permettre l'équilibration de l'échantillon. Les expériences de RMN ont été réalisées sur un spectromètre Bruker Advance DPX 400 NB avec une sonde QNP-Probe ( $^1\text{H}/^{31}\text{P}$ - $^{13}\text{C}$ - $^{19}\text{F}$ ). Les spectres de  $^{31}\text{P}$  ont été acquis à 161.97 MHz, en utilisant une séquence écho de Hahn avec cyclage de phase avec un découplage large bande sur le proton. Les paramètres d'acquisition sont les suivants: fenêtre spectrale de 50 kHz, temps d'impulsion  $\pi/2$  de 14  $\mu\text{s}$ , délai entre les impulsions de 50  $\mu\text{s}$ , délai de recyclage de 5 s, 128 scans ont été enregistrés et un balayage en température entre 2°C et 20°C a été réalisé. Un élargissement de bande de 50Hz et une correction de la ligne de base ont été appliqués avant la Transformée de Fourier. Les proportions de phases (lamellaire, hexagonale et isotrope) ont été déterminées par la simulation des spectres expérimentaux [221] (T. Pott et E. J. Dufourc, données non-publiées).

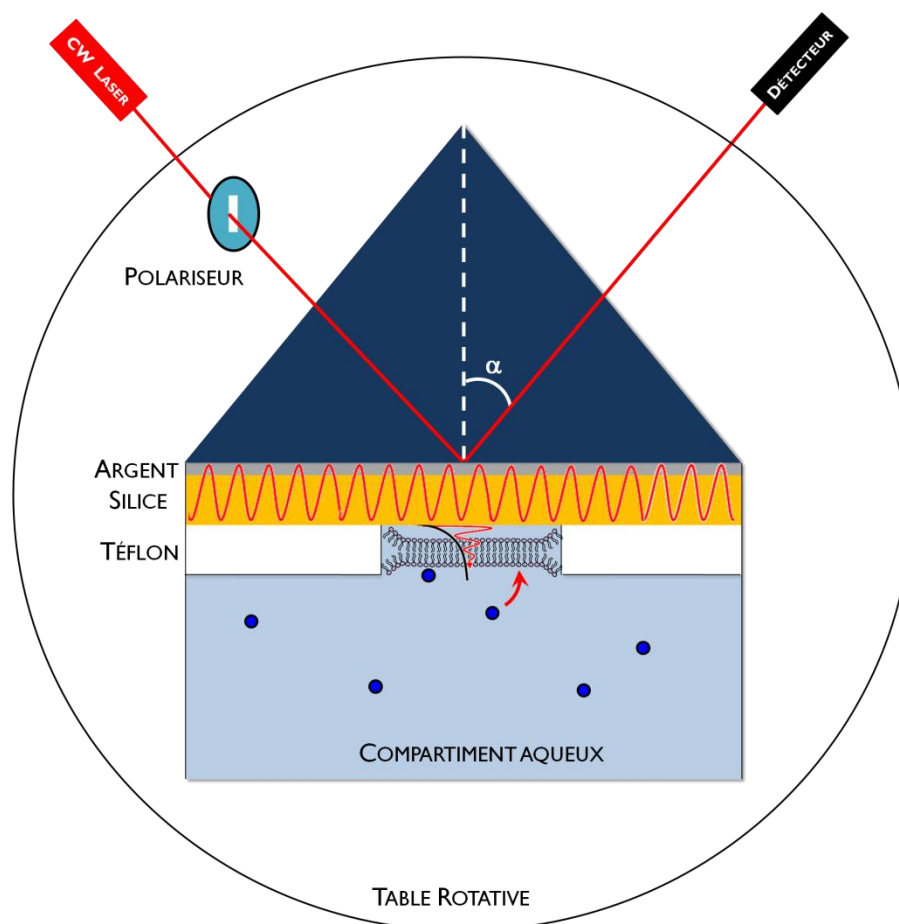
### II.10.2. RMN $^1\text{H}$

Les études RMN ont été réalisées en milieu micellaire en présence de dodecyl phosphocholine- $d_{38}$  (DPC- $d_{38}$ ), à 37°C. L'échantillon est préparé, à une concentration en peptide de 1 mM dans 50 mM de DPC- $d_{38}$  pour un volume final de 400  $\mu\text{L}$  ( $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$  9/1 v/v pH 5.5). Le rapport de concentration de 1mM pour le peptide et 50mM de (DPC- $d_{38}$ ) correspond à 1 peptide par micelle environ.

Les spectres 1D et 2D ont été enregistrés sur un spectromètre Bruker Avance III, 800 MHz équipé d'une cryosonde TCI  $^1\text{H}/^{13}\text{C}/^{15}\text{N}/^2\text{H}$  équipée de gradients Z. Les expériences 2D homonucléaires avec suppression du signal résiduel de l'eau ont été enregistrées : TOCSY pour « Total Correlation SpectroscopY » (séquence du type DIPSI, temps de mélange de 100 ms, nombre de scans 16, 226 incréments en F1 et un temps de recyclage de 2s) et NOESY pour « Nuclear Overhauser Effect SpectroscopY » (temps de mélange 100 ms, 32 scans par incréments, 229 incréments en F1 et un temps de recyclage de 2s). Une expérience 2D hétéronucléaire  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC (temps de mélange de 60 ms) en abondance naturelle a aussi été enregistrée. Les données RMN ont été traitées et analysées avec le logiciel TOPSPIN 3.2 (Bruker).

## II. 11. Résonance Plasmonique aux Ondes guidées (PWR)

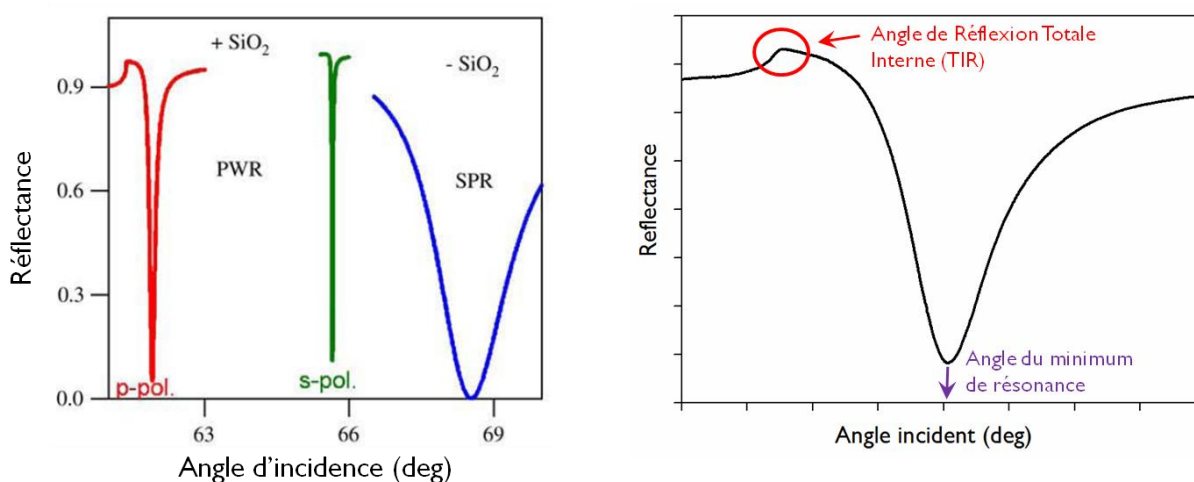
Les spectres de PWR sont produits à partir de l'excitation des oscillations des électrons conducteurs de surface (plasmons) par le faisceau d'un laser CW He-Ne polarisé (CW pour "Continuous Wave" ou Onde Continue; longueur d'onde de 632.8 nm) incident sur la surface d'un film métallique fin d'Argent, déposé sur un prisme et recouvert d'une couche diélectrique de silice. Les expériences sont réalisées dans des conditions de réflexion interne totale (TIR) et permet la formation d'une onde évanescence qui va sonder l'échantillon déposé à la surface du prisme jusqu'à une profondeur de l'ordre du micron (Figure 81). Les spectres de PWR correspondent à l'intensité de lumière réfléchie, en fonction de l'angle incident, excitée avec la lumière dont le vecteur électrique est soit parallèle (polarisation *s*) ou perpendiculaire (polarisation *p*) au plan de la surface du prisme. Les expériences ont été réalisées sur un appareil de PWR en version beta de Proterion Corp. (Piscataway, NJ) qui possède une résolution angulaire spectrale de 1 mdeg. La bicouche lipidique est immobilisée sur la surface du prisme et hydratée avec du tampon Tris 10 mM, dans lequel les peptides sont introduits.



**Figure 81.** Montage du PWR. Le système est positionné sur une table rotative permettant de varier l'angle du faisceau incident. Le prisme est constitué d'une couche d'argent (épaisseur ~50 nm) et de silice (épaisseur ~460 nm) et le bloc de téflon est placé sur le prisme.

La bicouche s'auto-assemble à partir d'une solution de 10 mg/mL de lipides dans du butanol/squalène (95:5 v:v). La méthode utilisée pour préparer la bicouche est basée sur la procédure décrite par Mueller et Rudin pour préparer des BLM à travers une fente dans un bloc de téflon [45]. Pour cela, une petite quantité de lipides (2,5  $\mu$ L) sont déposés dans la fente du bloc de téflon séparant la surface de silice du prisme de la phase aqueuse (Figure 81). La formation spontanée de la bicouche est déclenchée par l'ajout de tampon dans le compartiment de la cellule de PWR. Les molécules déposées sur la surface du résonateur modifient les caractéristiques de la formation de plasmons et peuvent ainsi être détectées et caractérisées (Figure 82) (pour plus de détails, voir [222]).

Le peptide a été injecté dans la cellule après formation et équilibration de la bicouche à des concentrations croissantes qui peuvent varier de 1 pM et 1  $\mu$ M. La quantité de peptide lié aux lipides est associée aux changements de minimum de résonance observés sur le spectre. Le PWR n'est sensible qu'aux propriétés optiques des matériaux déposés sur la surface du résonateur, il n'y a donc pas d'interférences provenant de la solution.



**Figure 82.** Spectres de PWR pour les polarisations *p* (spectre rouge) et *s* (spectre vert) comparés aux spectres obtenus pour la SPR (spectre bleu). Sur le spectre de droite sont représentés les angles caractéristiques du système déposé sur le prisme.

Les données de décalage du minimum de résonance en fonction de la concentration de peptide ajouté ont été tracées et ajustées grâce au logiciel GraphPad Prism grâce à une fonction hyperbolique qui décrit la fixation d'un ligand à son récepteur, et fournit la constante de dissociation ( $K_d$ ) du complexe:

$$Y = \frac{B_{max} \cdot x}{K_d + x} \quad (3)$$

où  $B_{max}$  représente la concentration maximale de peptide lié et le  $K_d$  la concentration de peptide nécessaire pour atteindre 50% du maximum de liaison [223].

Au cours de la liaison peptide/lipide, il peut se dérouler d'autres processus comme une réorganisation ou une solvation de la membrane, donc la constante de dissociation correspond à une constante de dissociation apparente. Une analyse graphique a été réalisée pour obtenir des informations sur les changements de densité de masse, de l'asymétrie structurale et de l'orientation moléculaire induits par les interactions bi-moléculaires sur la surface du prisme. En traçant les changements spectraux observés dans un système de coordonnées ( $s$ ,  $p$ ) où les axes de masse ( $\Delta_m$ ) et d'anisotropie ( $\Delta_{str}$ ) sont représentés en fonction du facteur de sensibilité du résonateur, la contribution des changements de masse et de structures peuvent être obtenus [224; 225].

Chaque point sur l'axe de masse et d'anisotropie peut être exprimé par des changements des coordonnées originales ( $\Delta p$  et  $\Delta s$ ) grâce aux équations suivantes:

$$\Delta_m = [(\Delta s)_m^2 + (\Delta p)_m^2]^{1/2} \quad (4)$$

$$\Delta_{str} = [(\Delta s)_{str}^2 + (\Delta p)_{str}^2]^{1/2} \quad (5)$$

Le facteur de sensibilité ( $S_f$ ) est une mesure de la sensibilité de l'instrument pour les polarisations  $s$  relative à la polarisation  $p$  ( $S_f = \Delta s / \Delta p$ ) et nécessaire pour déterminer les axes de masse et d'anisotropie. Celui-ci a été déterminé pour le prisme utilisé pour nos expériences et a une valeur de 0.74 [226].

**Avantages**

- ✓ Mesure de constantes d'affinité et de cinétique de liaison
- ✓ Apporte des informations de masse et d'anisotropie
- ✓ Aucun marquage des molécules n'est nécessaire

**Inconvénients**

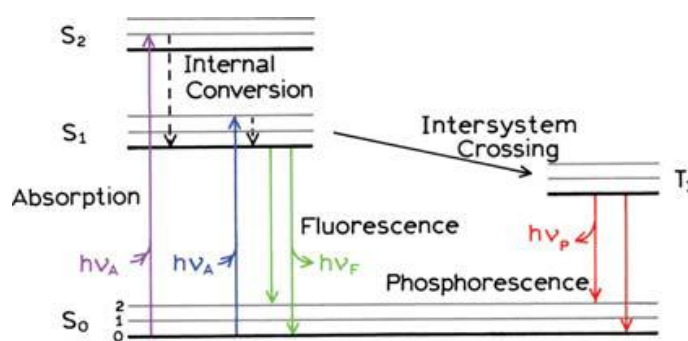
- ✓ Système très sensible et formations de bicouches parfois difficiles
- ✓ Constantes d'affinité obtenus apparentes et pas thermodynamiques

**Sensibilité**

- ✓ Mesure des  $K_d$  de la gamme du pM jusqu'au mM

## II. 12. Spectroscopie de Fluorescence

La fluorescence est un processus en plusieurs étapes qui correspond à l'émission d'un photon suite à l'excitation d'un fluorophore (Figure 83). En absorbant un photon d'énergie  $h\nu_{\text{ex}}$  fourni par une source extérieure (telle qu'un laser), un fluorophore passe de son état électronique fondamental  $S_0$  à un état singulet ( $S_n$ ). Après s'être partiellement désexcité jusqu'au niveau  $S_1$ , celui-ci peut retourner à son état fondamental  $S_0$  en émettant un photon : c'est l'émission de fluorescence [227; 228].

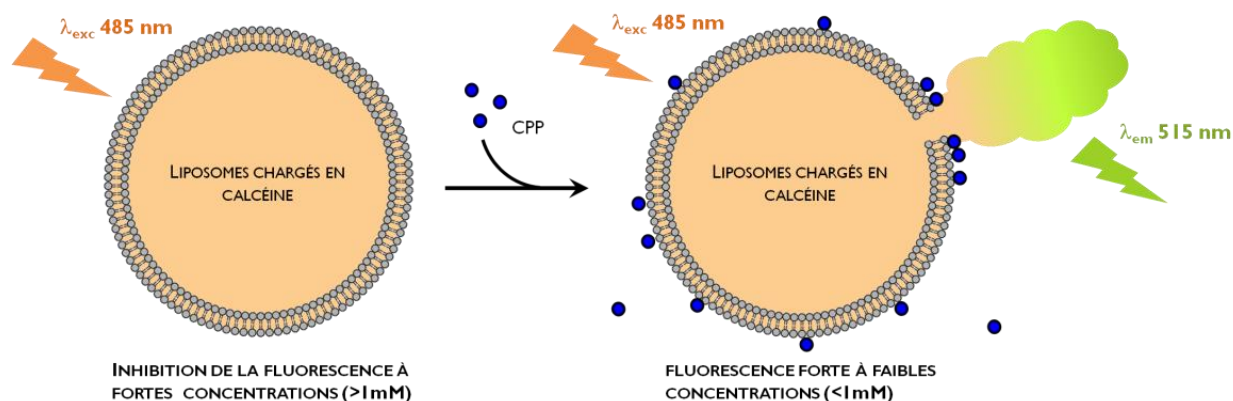


**Figure 83.** Diagramme d'énergie de Jablonski. D'après [227; 228].

### II.12.1. Fuites de calcéine

Pour les expériences de fuite de calcéine, des LUVs de 100 nm chargées en calcéine ont été préparées. La calcéine est un fluorophore puissant qui est excité à une longueur d'onde de 485 nm et émet de la fluorescence à 515 nm. A fortes concentrations (concentration > 10 mM) la fluorescence de la calcéine est auto-inhibée et une faible fluorescence basale est observée. Lorsque la calcéine est diluée (concentration < 10 mM) elle émet une forte fluorescence grâce à un rendement quantique élevé.

L'hydratation des films lipidiques a été réalisée avec du tampon calcéine. La préparation des LUVs s'est déroulée de la même manière que pour des LUVs normales mais le film lipidique a été hydraté par du tampon calcéine. La séparation des LUVs et de la calcéine présente en solution a été effectuée sur une colonne Sephadex-G75 de chromatographie gel filtration et le tampon d'élution a été utilisé.



**Figure 84.** Schéma représentant le principe d'une expérience de fuite de calcéine.

Un dosage phosphate a été réalisé après le passage des LUVs dans la colonne de gel filtration pour mesurer la concentration des lipides, d'après la méthode décrite par Rouser et collaborateurs [229]. Des solutions de liposomes ont été préparées à une concentration de 10  $\mu$ M et des concentrations croissantes de peptide ont été ajoutées. L'intensité de fluorescence a été mesurée dans un premier temps sans peptide pour vérifier que les liposomes ne fuient pas. La fluorescence a ensuite été mesurée sur une durée de 1h à 2,5 heures.

A la fin de l'expérience, la fuite maximale a été induite par l'ajout de 100  $\mu$ L de Triton X-100 à 10 % permettant de dissoudre la membrane sans entraîner d'interférence du signal de fluorescence. Le pourcentage de fuite de calcéine a été calculé selon l'équation suivante:

$$\% \text{ fuite de calcéine} = \frac{F_t - F_0}{F_f - F_0} * 100 \quad (6)$$

Le pourcentage de fuite de calcéine est la fraction de fluorophore relarguée par rapport à la fuite maximale observée en présence de Triton X-100.  $F_t$  est l'intensité de fluorescence mesurée à un temps  $t$ ,  $F_0$  est l'intensité de fluorescence au temps  $t_0$  et  $F_f$  est l'intensité de fluorescence après l'ajout final de Triton X-100. Une correction de dilution a été appliquée sur l'intensité de fluorescence mesurée après l'injection de Triton X-100. Chaque expérience a été réalisée en triplicat.



### II.12.2. Coefficient de partition de Nernst ( $K_p$ )

Les interactions peptide/lipide ont été mesurées en suivant les changements de spectres d'émission de fluorescence du Trp des peptides en présence de LUVs. La fluorescence intrinsèque des Trp a été mesurée avant et après ajout de concentrations croissantes de liposomes à une concentration fixe de peptide de 0,5  $\mu$ M.

La fluorescence a été mesurée à température ambiante sur un spectromètre Fluoromax-4 (Horiba). Les spectres d'émission de fluorescence ont été enregistrés entre 300 et 500 nm avec une longueur d'onde d'excitation de 280 nm, avec une largeur de fente de 5 nm pour l'excitation et 10 nm pour l'émission. La liaison du peptide aux lipides a été déterminée à partir de l'inhibition de fluorescence de l'intensité de fluorescence du Trp des peptides après l'ajout des LUVs.

L'intensité maximum de fluorescence a été tracée en fonction de la concentration de lipides ajoutée et ajustée en utilisant le modèle de partition simple (7), le modèle d'auto-inhibition ("self-quenching") (8) ou le modèle en 3 étapes décrit par Melo et Castanho [210] (pour plus de détails, voir le Chapitre IV) :

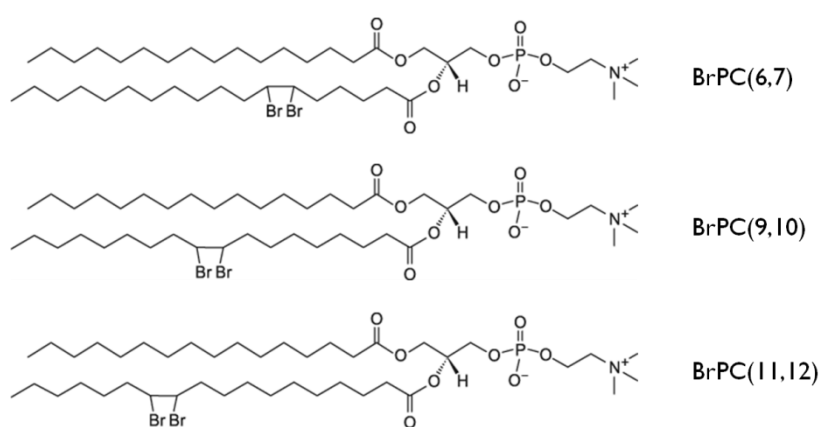
$$\frac{I}{I_w} = \frac{1 + K_p \gamma_L [L] I_L / I_w}{1 + K_p \gamma_L [L]} \quad (7)$$

$$\frac{I}{I_w} = \frac{1 + K_p \gamma_L [L] I_L / I_w}{1 + K_p \gamma_L [L] + k_2 K_p I_L} + \frac{1}{1 + K_p \gamma_L [L]} \quad (8)$$

où  $[L]$  représente la concentration en lipides totaux disponibles pour l'interaction avec le peptide,  $K_p$  représente le coefficient de partition de Nernst,  $k_2$  est proportionnel au ratio entre le taux d'auto-inhibition bimoléculaire et le taux de déclin de radiation,  $\gamma_L$  est le volume molaire des phospholipides, qui est 0.763  $M^{-1}$  pour les lipides utilisés dans cette étude.  $I_L$  et  $I_w$  sont les intensités de fluorescence que le mélange devrait émettre si tous les peptides se trouvaient en phase lipidique ou en phase aqueuse, respectivement.  $I_w$  peut être obtenu à partir de la mesure de  $I$  en absence de lipides;  $I_L$  est la valeur limite de l'intensité de fluorescence quand  $[L] \rightarrow \infty$  et est déterminé comme un paramètre du système avec  $K_p$ .

### II.1.2.3. Inhibition de fluorescence avec des lipides bromés

L'inhibition de fluorescence dépendante de la profondeur d'insertion des Trp ("DFQP"; "Depth-dependant Fluorescence Quenching Profile") a été mesurée sur des LUVs composées de DOPC et DOPC/DOPG (4:1 mol:mol) avec 30% de BrPC. 3 types de BrPC ont été utilisés (Figure 85): le BrPC(6,7) bromé sur les carbones 6 et 7, le BrPC(9,10) bromé sur les carbones 9 et 10 et le BrPC(11,12) bromé sur les carbones 11 et 12. Les proportions lipidiques de chaque vésicules sont: DOPC/BrPC (70:30 mol:mol) et DOPC/DOPG/BrPC (50:20:30 mol:mol:mol).



**Figure 85.** Structure des lipides bromés utilisés pour les expériences d'inhibition de fluorescence du Trp par des vésicules bromées.

Les intensités de fluorescence en absence de BrPC ont d'abord été mesurées pour les liposomes de DOPC et de DOPC/DOPG. Les spectres d'émission ont été enregistrés entre 300 nm et 500 nm avec un incrément de 1 nm, un temps d'intégration de 0,1 secondes et une longueur d'onde d'excitation de 280 nm. Le peptide a été ajouté à un ratio P/L de 1/50 et la concentration de peptide est de 0,5  $\mu\text{M}$  (pour RW16, RW9, RWFF9, RFWF9 et RWWF9) et de 0,8  $\mu\text{M}$  (pour RFWW9).

Les données ont été corrigées pour la dilution et la diffusion des vésicules. Les profils DFQP ont été ajustés aux données expérimentales avec Matlab en utilisant la méthode d'analyse de distribution (DA) [230; 231] et la méthode parallax (PM) [195; 232-234] :

$$\text{DA : } \ln \frac{F_0}{F(h)} = \frac{S}{\sigma \sqrt{2\pi}} \exp \left[ -\frac{(h - h_m)^2}{2\sigma^2} \right] \quad (9)$$

$$\text{PM : } \ln \frac{F_0}{F_{(h)}} = \pi C [R_c^2 - (h - h_m)^2] \quad (10)$$

où  $F_0$  est l'intensité de fluorescence en absence d'inhibiteur de fluorescence,  $F_{(h)}$  est l'intensité de fluorescence en présence d'inhibiteur de fluorescence pour une distance  $h$  (Å) à partir du centre de la bicouche et  $h_m$  est la profondeur d'insertion moyenne des résidus Trp. Dans le modèle de DA, les données sont ajustées avec une fonction gaussienne où  $\sigma$  dénote la dispersion, qui est reliée à la distribution en profondeur des chromophores et  $S$  est l'aire correspondant au profil d'inhibition, qui est relié à la capacité des Trp à être inhibés. La méthode PM ajuste les données avec une parabole tronquée et  $R_c$  est le rayon d'inhibition de fluorescence. Les distances moyennées des bromes à partir du centre de la bicouche ( $h$ ) sont de 11,0, 8,3, and 6,5 Å pour BrPC(6,7), BrPC(9,10) et BrPC(11,12), respectivement [195].

#### II.12.4. Inhibition de la fluorescence par l'acrylamide

Les interactions peptide/lipide sont accompagnées de changements de l'accessibilité des peptides aux inhibiteurs de fluorescence du Trp. Des expériences d'inhibition de fluorescence par l'acrylamide ont été effectuées sur une solution de peptide de 0,5  $\mu\text{M}$  en absence et en présence de LUVs de différentes compositions en ajoutant des concentrations croissantes d'acrylamide 4 M.

Les mélanges peptide/lipide (à un ratio P/L de 1/50) ont été incubés 15 minutes à température ambiante précédant les expériences de titration de l'acrylamide. La longueur d'onde d'excitation est de 295 nm au lieu de 280 nm pour réduire les effets d'absorbance de l'acrylamide. Les intensités de fluorescence ont été mesurées après ajout de l'acrylamide à température ambiante.

Les constantes de Stern-Volmer,  $K_{SV}$ , ont été obtenues à partir du tracé de  $F_0/F$  en fonction de la concentration d'acrylamide ( $[Q]$ ), avec  $F_0$  et  $F$  les intensités de fluorescence en absence et en présence d'inhibiteur de fluorescence, respectivement. Le facteur d'accessibilité normalisé ( $\text{naf}$ ) (correspond au  $K_{SV}$  du peptide en présence de lipides par rapport au  $K_{SV}$  du peptide dans le tampon) a été calculé pour pouvoir comparer les valeurs de  $K_{SV}$  entre chaque peptide et/ou entre différentes compositions lipidiques.

**Avantages**

- ✓ Mesure de constantes d'affinité et cinétique de liaison
- ✓ Aucun marquage des molécules n'est nécessaire

**Inconvénients**

- ✓ Nécessite la présence d'un fluorophore intrinsèque aux molécules étudiées
- ✓ Inhibition de la fluorescence

**Sensibilité**

- ✓ Mesure des concentrations jusqu'au nM

### II.12.5. Internalisation dans les liposomes

Des LUVs de taille 100 nm de DOPC ou DOPG chargées en calcéine et en acrylamide ont été réalisées. Pour cela, les films lipidiques ont été hydratés avec le tampon H (contenant de la calcéine et de l'acrylamide). Les liposomes ont été passés sur une colonne de gel filtration afin de séparer les LUVs de la calcéine et de l'acrylamide en solution. Le tampon d'élution E a été utilisé pour l'élution de la colonne. Un test de dosage phosphate a ensuite été effectué afin de quantifier la concentration de lipides en sortie de colonne.

Pour les expériences de fluorescence, le peptide ou le Trp (contrôle négatif) a été incubé pendant 15 minutes en présence de LUVs sans acrylamide ou chargées en acrylamide. La fluorescence a été mesurée puis 100 mM d'acrylamide ont été ajoutés afin d'inhiber complètement la fluorescence du peptide qui n'est pas internalisé ou à la surface des membranes. Les données de fluorescence ont été normalisées par rapport à l'intensité du peptide seul en solution.

### II. 13. Dichroïsme circulaire (CD)

Le dichroïsme circulaire (CD) est observé lorsque des objets optiquement actifs absorbent la lumière circulaire polarisée droite et gauche de façon différente.

Une onde électromagnétique est définie comme la somme de deux ondes circulaires polarisées respectivement droite et gauche. L'onde polarisée droite possède une composante électrique  $E_D$  et celle polarisée gauche possède une composante électrique  $E_G$ . La somme de ces deux ondes peut-être décrite de différentes manières selon l'absorption de la lumière polarisée (Figure 86).

Si les deux ondes circulaires polarisées possèdent la même fréquence et la même amplitude, alors la somme de leurs champs électriques sera linéaire (Figure 86A).

Si la lumière polarisée traverse une solution optiquement active, les ondes circulaires polarisées droite et gauche ne vont plus se propager à la même vitesse à travers celle-ci, ce qui va entraîner un déphasage. En sortie de solution, les deux ondes vont à nouveau se propager à la même vitesse mais conserveront ce déphasage.

La somme des deux ondes circulaires va alors former une ellipse dont l'ellipticité ( $\Delta\epsilon$ ) sera mesurée avec un dichrographe (Figure 86B).

Ce phénomène est dû à une diminution de l'amplitude d'une des composantes droite ou gauche qui modifie la résultante des champs électriques droite ( $E_D$ ) ou gauche ( $E_G$ ).

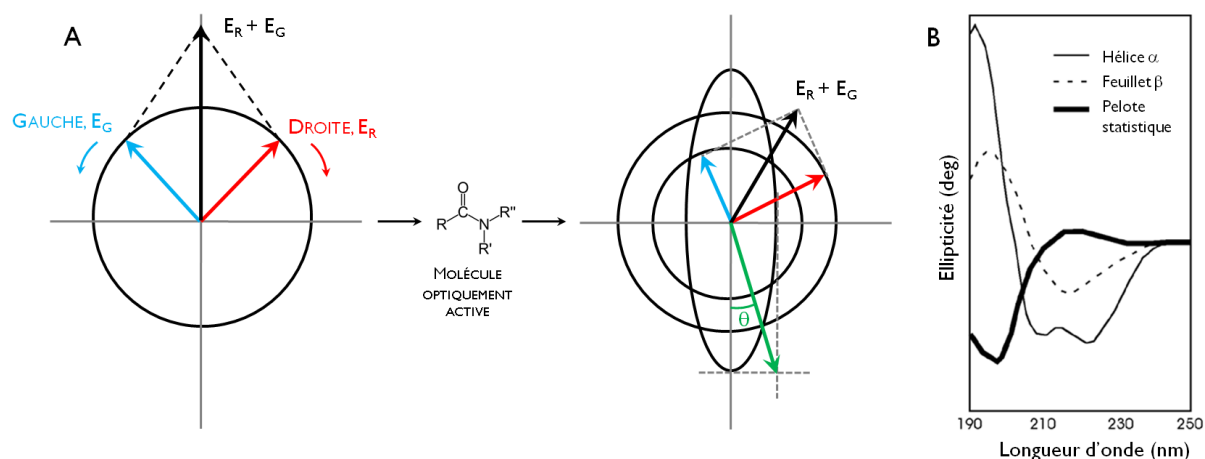
Si l'ellipticité est égale à  $45^\circ$ , la résultante formera un cercle : on parle alors de dichroïsme total. Une onde plane correspond à une ellipticité nulle.

L'expérience de CD consiste donc à mesurer la différence entre l'ellipticité droite et gauche ( $\Delta\epsilon$ ) exprimée en degrés. La chiralité des acides aminés confère aux macromolécules biologiques une activité optique et la liaison peptidique absorbe au dessous de 250nm. L'ellipticité ( $\theta$ ) est l'angle de l'ellipse avec  $\tan \theta = \text{petit axe}/\text{grand axe}$ . La relation reliant la différence d'ellipticité gauche et droite et l'ellipticité est donnée par l'équation :

$$[\theta] = 3300 * \frac{\Delta\epsilon}{n} \quad (11)$$

où n représente le nombre de résidus.

En fonction des orientations de la liaison peptidique des molécules étudiées, le spectre de CD adopte un profil particulier propre à chaque structure secondaire (Figure 86B).



**Figure 86. (A)** Phénomène de dichroïsme circulaire. Après interaction avec une molécule optiquement active (chromophore), la différence d'absorbance entre la lumière polarisée circulairement à droite ( $E_R$ ) et la lumière polarisée circulairement à gauche ( $E_G$ ) donne une ellipse d'angle  $\theta$  **(B)** Spectres caractéristiques des structures secondaires en hélice  $\alpha$ , feuillet  $\beta$  ou pelote statistique.

Les expériences de CD ont été réalisées à 37°C et des LUVs de 1mg/mL ont été préparées dans du tampon phosphate 10 mM. Le peptide a été ajouté à des concentrations variant entre 25  $\mu$ M et 110  $\mu$ M pour obtenir des ratios P/L de 1/50 à 1/10.

Les données ont été normalisées afin d'exprimer l'ellipticité molaire par résidu ( $\text{deg} \cdot \text{dmol}^{-1} \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{résidu}^{-1}$ ) grâce à l'équation suivante:

$$[\theta] = \frac{\theta * 10^{-3}}{c * l * N_R * 10^{-9}} \quad (12)$$

où  $\theta$  est l'ellipticité exprimée en millidegré,  $c$  représente la concentration de peptide en  $\mu$ M,  $l$  la longueur du faisceau traversant la cellule de CD en cm et  $N_R$  le nombre de liaisons peptidiques.

Les spectres de CD ont été lissés grâce à la fonction de Savitzky-Golay et la déconvolution des spectres ont été réalisées à l'aide du logiciel CDFriend développé au laboratoire CBMN par S. Buchoux (non publié). Des tests de déconvolution spectrales ont été réalisés avec les logiciels CDNN et CDPro afin de comparer les différentes proportions de structure secondaire obtenues avec chaque logiciel. Cependant, ces logiciels ajustent les courbes de CD à partir de bases de données de protéines et non de peptides et nous avons obtenus des déconvolutions incorrectes avec ces logiciels. Pour ces raisons, le logiciel CDFriend s'est avéré le plus efficace pour permettre une déconvolution adéquate de petits peptides comme RW16 ou RW9 et les analogues RX9.

**Avantages**

- ✓ Permet de déterminer une structure secondaire rapidement
- ✓ Aucun marquage des molécules n'est nécessaire

**Inconvénients**

- ✓ Information globale sur la structure secondaire
- ✓ Déconvolution et attribution de structure secondaire parfois problématique pour les petites molécules
- ✓ Nécessité d'utiliser un tampon qui ne diffracte pas la lumière

**Sensibilité**

- ✓ Mesure des concentrations à partir du  $\mu\text{M}$

## II. 14. Infrarouge à Transformée de Fourier (ATR-FTIR)

La spectroscopie dans le moyen infrarouge consiste à envoyer un rayonnement lumineux de domaine spectral compris entre 350 et 4500  $\text{cm}^{-1}$  (Figure 76) afin d'exciter les niveaux vibrationnels des molécules. Chaque groupement fonctionnel d'une molécule possède des fréquences de vibration caractéristiques. Un spectre infrarouge permet ainsi de mettre en évidence la présence de certains groupements fonctionnels, et peut servir de "carte d'identité spectroscopique" pour une molécule ou un matériau.

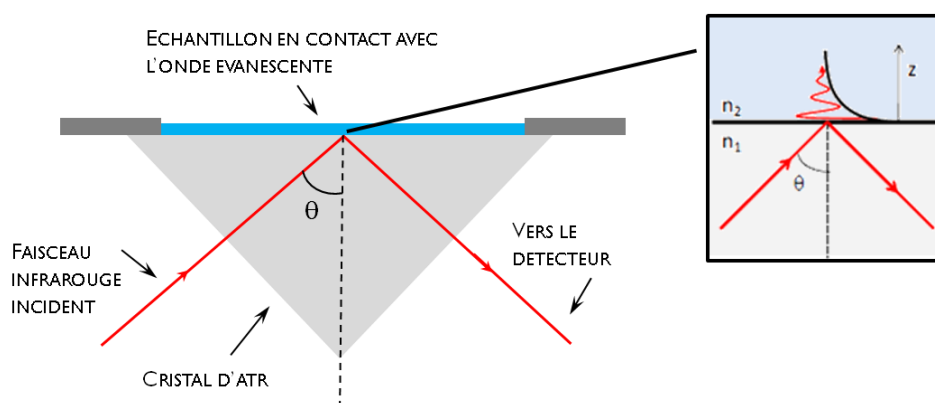
En raison de la forte absorption des rayonnements moyens IR par les molécules d'eau présentes dans les systèmes biologiques nous avons utilisé la spectroscopie FTIR-ATR (Infrarouge à Transformée de Fourier en Réflexion Totale Atténuée). L'infrarouge à transformée de Fourier (FTIR) permet de convertir les données de l'interférogramme en données spectrales. La condition de Réflexion Totale Atténuée (ATR) permet la formation d'une onde évanescente le long du cristal qui est en partie absorbée par l'échantillon.

L'intérêt de cette technique permet de travailler sur des systèmes en milieu aqueux, donc proche des conditions biologiques, et il devient possible d'étudier *in situ* des protéines membranaires reconstituées dans des membranes modèles et de déterminer la structure et l'orientation de peptides ou de protéines dans des membranes modèles.

Dans le montage utilisé (Golden Gate®, Specac), le faisceau IR se propage dans un monocristal d'indice de réfraction élevé, dans notre cas, un cristal de Germanium (indice de réfraction,  $n_1=4$ ), transparent en IR (

Figure 87). Comme l'indice de réfraction de ce cristal ( $n_1$ ) est supérieur à celui de l'échantillon ( $n_2$ ), au-delà d'un certain angle d'incidence appelé angle critique  $\theta_c$ , le faisceau subit des réflexions totales à l'interface cristal/échantillon. La réflexion totale est décrite telle que:  $\theta > \theta_c$  avec  $\theta_c = \sin^{-1} (n_2/n_1)$ . Les conditions de continuité du champ électrique à l'interface imposent l'existence dans l'échantillon d'une onde évanescente, qui se propage perpendiculairement au plan du cristal avec une amplitude qui s'amortit exponentiellement suivant la normale au cristal. La profondeur de pénétration de l'onde évanescente dépend de l'angle d'incidence du faisceau IR ( $45^\circ$ ), de la longueur d'onde et des indices des différents milieux.

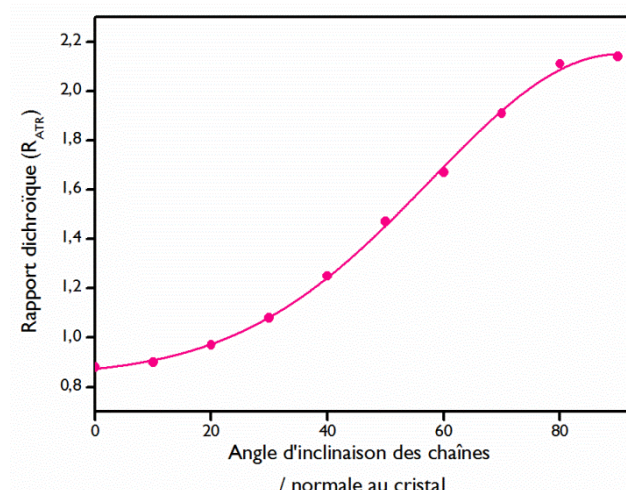




**Figure 87.** Schéma du montage GoldenGate utilisé. Un faisceau infrarouge est dirigé à un certain angle  $\theta$  sur un cristal d'indice de réfraction élevé. La réflexion interne crée une onde évanescente qui s'étend à la surface du cristal dans l'échantillon en contact avec le cristal. Cette onde permet de sonder les molécules présentes à la surface du cristal. L'agrandissement de la zone d'échantillon représente l'onde évanescente à proximité de la surface du cristal orientée selon l'axe  $z$ .

La profondeur varie entre 150 et 700 nm dans le domaine spectral 4000-1000  $\text{cm}^{-1}$ . La mesure de l'intensité du faisceau sortant est donc atténuée aux longueurs d'onde auxquelles l'échantillon absorbe et fournit une information sur les molécules proches de la surface du cristal. L'échantillon peut se trouver en solution, mais il est également possible de déposer à la surface du cristal une ou plusieurs bicouches lipidiques. Il est ainsi possible, d'étudier la structure du peptide en solution et en présence de membranes modèles. De plus, les phospholipides possèdent des bandes très caractéristiques en IR et l'ajout de peptide peut entraîner des modifications de ces bandes d'absorption pouvant livrer des informations sur l'organisation de la bicouche supportée.

Par ailleurs, l'utilisation de lumière polarisée permet d'obtenir des informations sur l'orientation des molécules par rapport au cristal grâce à la mesure du rapport dichroïque,  $R_{\text{ATR}} = A_p/A_s$  où  $A_p$  et  $A_s$  représentent les absorbances d'une bande donnée pour les polarisations  $p$  et  $s$ , respectivement. Il est ainsi possible de prédire l'orientation d'une structure par rapport à la surface du cristal à partir du rapport dichroïque.



**Figure 88.** Graphique représentant le rapport dichroïque ( $R_{ATR}$ ) des bandes  $CH_2$  à  $2853\text{cm}^{-1}$  sur un cristal de germanium en fonction de l'angle d'inclinaison des chaînes lipidiques par rapport à la normale au cristal. D'après [235].

Pour ces expériences, des SUVs de concentrations  $3\text{mg/mL}$  et de compositions lipidiques DOPC ou DOPC:DOPG (4:1 mol:mol) ont été préparées dans du  $D_2O$  (100%). Les SUVs ont été déposées sur le cristal de germanium.

Avant d'analyser les différents échantillons, les vésicules sont laissées 5 minutes sur le cristal afin qu'elles éclatent en bicouche sur le cristal. Après drainage des vésicules en excès, les spectres de la bicouche sont enregistrés aux 2 polarisations. Les intensités des bandes d'absorption des vibrations anti-symétriques des  $CH_2$  et  $CH_3$  renseignent sur la quantité de matière déposée sur le cristal. Ainsi, des simulations et des résultats antérieurs ont montré que pour une bicouche lipidique d'environ  $40 \text{ \AA}$  déposée sur le cristal, on attend une intensité autour de  $1.3 \times 10^{-3}$  en polarisation  $p$  [235].

Le rapport des intensités d'absorbance en  $p$  ( $A_p$ ) et  $s$  ( $A_s$ ) nous fournit une information sur l'orientation des lipides dans la membrane. Avec le rapport obtenu, on en déduit ainsi l'angle d'inclinaison des chaînes lipidiques par rapport à la normale au cristal (Figure 88). Plus l'angle d'inclinaison sera faible, et plus les chaînes des lipides dans la bicouche seront verticales.

Le peptide est ensuite ajouté (5 nmoles) et laissé incubé pendant 15 minutes avec la membrane. Un spectre est ensuite enregistré pour les deux polarisations et avec 400 scans et une résolution de  $4 \text{ cm}^{-1}$ . La soustraction du spectre de  $D_2O$  et une correction de ligne de base sont appliquées grâce logiciel Omnic.

La normalisation du spectre est effectuée et une décomposition du spectre pour identifier le nombre d'onde et le pourcentage des bandes caractéristiques de structures secondaires sont réalisées avec le logiciel Grams. Une fonction de type Gaussienne/Lorentzienne (75/25) a été utilisée et une largeur de bande entre 20-35  $\text{cm}^{-1}$  a été appliquée. Les nombres d'ondes suivants ont été appliqués pour les différentes structures secondaires [236; 237] : coude  $\beta$  : 1670  $\text{cm}^{-1}$ , hélice  $\alpha$  : 1656  $\text{cm}^{-1}$ , pelote statistique : 1646  $\text{cm}^{-1}$ , feuillet  $\beta$  : 1633  $\text{cm}^{-1}$ . Les spectres ATR ont été enregistrés sur un spectromètre ThermoScientific Nicolet 6700 équipé d'un détecteur MCT refroidi à 77 K.

Les peptides étudiés au cours de cette thèse possèdent un nombre important d'Arg et le contre-ion TFA présente une bande d'absorption importante vers 1673  $\text{cm}^{-1}$ . Pour s'affranchir de ce signal, les peptides ont subi préalablement un échange TFA/HCl permettant de remplacer le TFA par des ions HCl. Pour cela, les peptides ont été incubés dans de l'eau avec 10 mM d'acide chlorhydrique pendant 5 minutes à température ambiante puis sont lyophilisés pendant une nuit. Cette étape a été répétée 3 fois et l'élimination complète du TFA a été vérifiée par RMN du  $^{19}\text{F}$ .

#### Avantages

- ✓ Analyse rapide de structure secondaire et d'orientation des molécules
- ✓ Aucun marquage des molécules n'est nécessaire

#### Inconvénients

- ✓ Formations des bicouches de compositions complexes parfois difficiles
- ✓ Ne visualise que les systèmes proches de la surface du cristal

#### Limites/Sensibilité

- ✓ Mesure des concentrations à partir de la nmole

## II. 15. Microscopie électronique à Transmission (Cryo-TEM)

Pour les expériences de Cryo-TEM, RW16 a été incubé avec des LUVs de DOPC ou de DOPG (1mM) dans du tampon Tris 10 mM pour obtenir une concentration finale de peptide de 40  $\mu\text{M}$  (ratio P/L de 1/25).

Après 1 heure d'incubation, 5  $\mu$ L d'échantillon ont été déposés sur une grille couverte partiellement de carbone (Ted pella) placée dans un dispositif automatique plongeant et congelant immédiatement l'échantillon (EM GP Leica) et permettant un contrôle parfait de la température (15°C) et de l'humidité (70%) extérieures à l'échantillon. L'excès d'échantillon est essuyé avec du papier filtre et la grille est plongée dans un bain d'éthane liquide et maintenu à -196°C avec de l'azote liquide.

L'échantillon est maintenu à une température d'environ -170°C, en utilisant un cryoportoir (Gatan, CA, USA) et observés avec un microscope électronique FEI Tecnai F20 opérant à 200 kV et avec des grossissements de 19,000 x ou 50,000 x sous des conditions à faibles doses. Les images ont été enregistrées avec une caméra 2k x 2k USC 1000 scan-lent CCD et analysées en utilisant le logiciel ImageJ.

**Avantages**

- ✓ Visualisation directe des systèmes étudiés

**Inconvénients**

- ✓ Observation de systèmes figés
- ✓ Nécessite un marquage des molécules étudiées

**Sensibilité**

- ✓ Observation d'objets de taille du  $\mu$ m

## II. 16. Dynamique Moléculaire (MD)

Pour l'étude de RW16 en présence de lipides par simulation de MD, trois systèmes ont été construits, deux avec une représentation en tout-atome ("All Atom", AA) et un avec une représentation gros-grain ("Coarse Grain", CG). Les trois systèmes se composent d'une bicouche zwitterionique de DOPC et RW16 a été construit en hélice  $\alpha$  100 % (à partir de sa séquence à l'aide de l'outil PepBasis3D de la plateforme Mobyly@RPBS) car RW16 est majoritairement structuré en hélice  $\alpha$  (60 %) lorsqu'il interagit avec une membrane zwitterionique. La concentration en NaCl est de 150 mM comme dans les conditions expérimentales des expériences de spectroscopie de fluorescence du Trp. Pour obtenir cette concentration, des molécules d'eau ont été remplacées par le nombre adéquat d'ions.

- Systèmes Tout-Atome (AA)

Pour les simulations en tout-atome, le peptide est protégé aux extrémités par un groupement acétyle en N-ter et par un groupement amide en C-ter. La bicouche lipidique est composée de 100 molécules de DOPC. RWI6 a été placé parallèlement au plan de la membrane dans le premier système, à environ 10 Å des têtes polaires de la membrane. La bicouche a été hydratée avec de l'eau (~40 molécules d'eau par lipide) et des ions Na<sup>+</sup> et Cl<sup>-</sup> (150 mM).

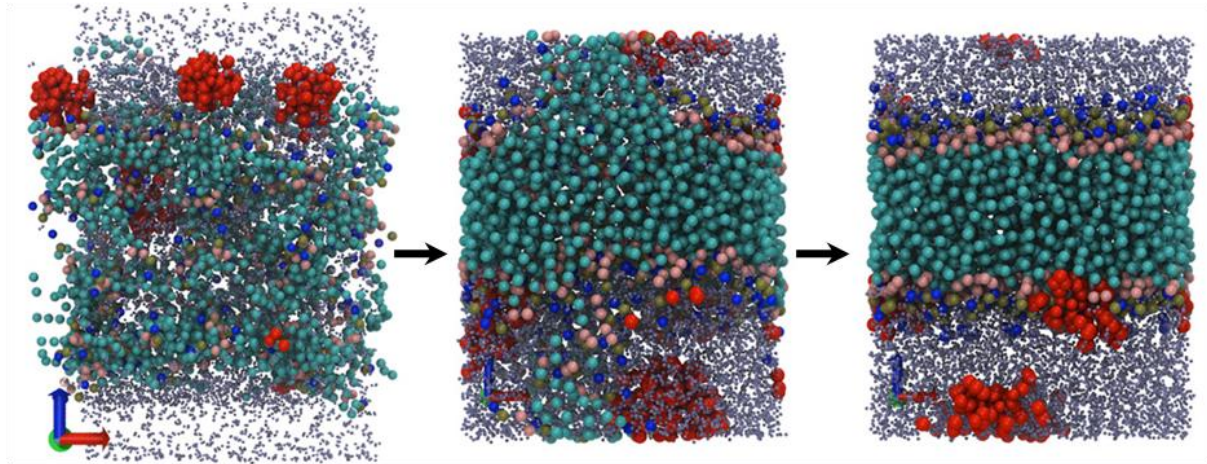
Dans le second système, le peptide est pré-inséré dans la bicouche (Fig. 3). La position du peptide a été obtenue grâce à une simulation gros-grain d'auto-assemblage avec un seul peptide. Une membrane de même taille sans peptide a été simulée dans les mêmes conditions pour effectuer des comparaisons.

- Systèmes Gros-grain (CG)

Les systèmes Gros-grain ont été construits en réalisant des simulations d'auto-assemblage. L'auto-assemblage consiste à simuler l'assemblage spontané du système en partant des éléments placés aléatoirement dans la boîte de simulation.

Ce système va tendre vers un état conformationnel qui est énergétiquement plus favorable en s'ordonnant. La structure gros-grain de RWI6 a été convertie à partir de la structure tout-atome. La Figure 89 montre plusieurs étapes de ce phénomène, où les lipides mélangés à l'eau s'organisent en bicouche afin de réduire la tension de surface et minimiser l'énergie du système.

Dans ces simulations, les systèmes sont plus grands qu'en tout-atome : 200 molécules de DOPC, 3000 molécules d'eau et 5 peptides. Le système ayant servi à placer le peptide en tout-atome est construit de la même manière cependant, le système contient 100 lipides, 1 peptide et les ions correspondants.



**Figure 89.** Images de la progression de l'auto-assemblage d'un système gros grain, prises respectivement à 0, 5,5 et 40 ns. Les peptides sont représentés en rouge, les molécules d'eau en points bleus et les molécules de DOPC en sphère (avec les chaînes aliphatiques en cyan, les têtes polaires en bleu et kaki et les glycérols en rose).

**Avantages**

- ✓ Simulation et visualisation des mouvements des atomes et des molécules
- ✓ Apporte de nombreuses informations physico-chimiques sur les systèmes étudiés : thermodynamique, paramètre d'ordre, ...
- ✓ Aucun marquage des molécules n'est nécessaire

**Inconvénients**

- ✓ Ne fournit pas de preuves expérimentales
- ✓ Simulations lentes dans le cas de systèmes complexes

**Sensibilité**

- ✓ Mesure des événements à partir de la picoseconde







# REFERENCES



- 
- [1] Stanzl EG, Trantow BM, Vargas JR, Wender PA, Fifteen years of cell-penetrating, guanidinium-rich molecular transporters: basic science, research tools, and clinical applications, *Acc Chem Res* (2013), 46: 2944-2954.
- [2] Danielli JF, Davson H, A contribution to the theory of permeability of thin films, *J Cell Comp Physiol* (1935), 5: 13.
- [3] Gorter E, Grendel F, On Bimolecular Layers of Lipoids on the Chromocytes of the Blood, *J Exp Med* (1925), 41: 439-443.
- [4] Robertson JD, The molecular structure and contact relationships of cell membranes, *Prog Biophys Mol Biol* (1960), 10: 343-418.
- [5] Benson AA, On the orientation of lipids in chloroplast and cell membranes, *J Am Oil Chem Soc* (1966), 43: 265-270.
- [6] Green DE, Vanderkooi G, Biological membrane structure, I. The protein crystal model for membranes, *Proc Natl Acad Sci U S A* (1970), 66: 615-621.
- [7] Singer SJ, Nicolson GL, The fluid mosaic model of the structure of cell membranes, *Science* (1972), 175: 720-731.
- [8] Karnovsky MJ, Kleinfeld AM, Hoover RL, Klausner RD, The concept of lipid domains in membranes, *J Cell Biol* (1982), 94: 1-6.
- [9] Simons K, Ikonen E, Functional rafts in cell membranes, *Nature* (1997), 387: 569-572.
- [10] Vance DE, Vance JE *Biochemistry of lipids, lipoproteins and membranes* (2008), 5th edn. Amsterdam ; Boston: Elsevier.
- [11] Stillwell W Chapter 10 - Lipid Membrane Properties. In *An Introduction to Biological Membranes*, Stillwell W (ed), (2013), pp 175-214. San Diego: Elsevier
- [12] Miller CE, Majewski J, Faller R, Satija S, Kuhl TL, Cholera toxin assault on lipid monolayers containing ganglioside GM1, *Biophys J* (2004), 86: 3700-3708.
- [13] Stillwell W Chapter 5 - Membrane Polar Lipids. In *An Introduction to Biological Membranes*, Stillwell W (ed), (2013), pp 57-83. San Diego: Elsevier
- [14] Quinn PJ, Wolf C, The liquid-ordered phase in membranes, *Biochim Biophys Acta* (2009), 1788: 33-46.
- [15] Brown DA, London E, Structure and origin of ordered lipid domains in biological membranes, *J Membr Biol* (1998), 164: 103-114.
- [16] van der Goot FG, Harder T, Raft membrane domains: from a liquid-ordered membrane phase to a site of pathogen attack, *Semin Immunol* (2001), 13: 89-97.
- [17] Kyte J, Doolittle RF, A simple method for displaying the hydropathic character of a protein, *J Mol Biol* (1982), 157: 105-132.

- [18] Arkin IT, Brunger AT, Statistical analysis of predicted transmembrane alpha-helices, *Biochim Biophys Acta* (**1998**), 1429: 113-128.
- [19] Helenius A, Simons K, Solubilization of membranes by detergents, *Biochim Biophys Acta* (**1975**), 415: 29-79.
- [20] Burn P, Amphitropic proteins: a new class of membrane proteins, *Trends Biochem Sci* (**1988**), 13: 79-83.
- [21] Reitsma S, Slaaf DW, Vink H, van Zandvoort MA, oude Egbrink MG, The endothelial glycocalyx: composition, functions, and visualization, *Pflugers Arch* (**2007**), 454: 345-359.
- [22] Varki A, Sialic acids as ligands in recognition phenomena, *FASEB J* (**1997**), 11: 248-255.
- [23] Ruoslahti E, Yamaguchi Y, Proteoglycans as modulators of growth factor activities, *Cell* (**1991**), 64: 867-869.
- [24] Bernfield M, Gotte M, Park PW, Reizes O, Fitzgerald ML, Lincecum J, Zako M, Functions of cell surface heparan sulfate proteoglycans, *Annu Rev Biochem* (**1999**), 68: 729-777.
- [25] Stewart MD, Sanderson RD, Heparan sulfate in the nucleus and its control of cellular functions, *Matrix Biol* (**2014**), 35C: 56-59.
- [26] Blackhall FH, Merry CL, Davies EJ, Jayson GC, Heparan sulfate proteoglycans and cancer, *Br J Cancer* (**2001**), 85: 1094-1098.
- [27] Bretscher MS, Phosphatidyl-ethanolamine: differential labelling in intact cells and cell ghosts of human erythrocytes by a membrane-impermeable reagent, *J Mol Biol* (**1972**), 71: 523-528.
- [28] Bretscher MS, Asymmetrical lipid bilayer structure for biological membranes, *Nat New Biol* (**1972**), 236: 11-12.
- [29] Fernandez Moran H, Oda T, Blair PV, Green DE, A Macromolecular Repeating Unit of Mitochondrial Structure and Function. Correlated Electron Microscopic and Biochemical Studies of Isolated Mitochondria and Submitochondrial Particles of Beef Heart Muscle, *J Cell Biol* (**1964**), 22: 63-100.
- [30] Martin SJ, Reutelingsperger CP, McGahon AJ, Rader JA, van Schie RC, LaFace DM, Green DR, Early redistribution of plasma membrane phosphatidylserine is a general feature of apoptosis regardless of the initiating stimulus: inhibition by overexpression of Bcl-2 and Abl, *J Exp Med* (**1995**), 182: 1545-1556.
- [31] Connor J, Bucana C, Fidler IJ, Schroit AJ, Differentiation-dependent expression of phosphatidylserine in mammalian plasma membranes: quantitative assessment of outer-leaflet lipid by prothrombinase complex formation, *Proc Natl Acad Sci U S A* (**1989**), 86: 3184-3188.

- [32] Utsugi T, Schroit AJ, Connor J, Bucana CD, Fidler IJ, Elevated expression of phosphatidylserine in the outer membrane leaflet of human tumor cells and recognition by activated human blood monocytes, *Cancer Res* (1991), 51: 3062-3066.
- [33] Stillwell W Chapter 9 - Basic Membrane Properties of the Fluid Mosaic Model. In *An Introduction to Biological Membranes*, Stillwell W (ed), (2013), pp 131-174. San Diego: Elsevier
- [34] Frye LD, Edidin M, The rapid intermixing of cell surface antigens after formation of mouse-human heterokaryons, *J Cell Sci* (1970), 7: 319-335.
- [35] Pucadyil TJ, Chattopadhyay A, Effect of cholesterol on lateral diffusion of fluorescent lipid probes in native hippocampal membranes, *Chem Phys Lipids* (2006), 143: 11-21.
- [36] Kusumi A, Sako Y, Yamamoto M, Confined lateral diffusion of membrane receptors as studied by single particle tracking (nanovid microscopy). Effects of calcium-induced differentiation in cultured epithelial cells, *Biophys J* (1993), 65: 2021-2040.
- [37] Daleke DL, Regulation of transbilayer plasma membrane phospholipid asymmetry, *J Lipid Res* (2003), 44: 233-242.
- [38] Davis A, Business Basics, *Journal* (2005).
- [39] Veatch SL, Keller SL, Seeing spots: complex phase behavior in simple membranes, *Biochim Biophys Acta* (2005), 1746: 172-185.
- [40] Luzzati V, Biological significance of lipid polymorphism: the cubic phases, *Curr Opin Struct Biol* (1997), 7: 661-668.
- [41] Seddon JM, Structure of the inverted hexagonal (HII) phase, and non-lamellar phase transitions of lipids, *Biochim Biophys Acta* (1990), 1031: 1-69.
- [42] Lindblom G, Rilfors L, Cubic phases and isotropic structures formed by membrane lipids, *Biochim Biophys Acta* (1989), 988: 221 - 256.
- [43] Cardoso AM, Trabulo S, Cardoso AL, Lorents A, Morais CM, Gomes P, Nunes C, Lucio M, Reis S, Padari K, Pooga M, Pedroso de Lima MC, Jurado AS, S4(13)-PV cell-penetrating peptide induces physical and morphological changes in membrane-mimetic lipid systems and cell membranes: implications for cell internalization, *Biochim Biophys Acta* (2012), 1818: 877-888.
- [44] Morein S, Koeppe IR, Lindblom G, de Kruijff B, Killian JA, The effect of peptide/lipid hydrophobic mismatch on the phase behavior of model membranes mimicking the lipid composition in Escherichia coli membranes, *Biophys J* (2000), 78: 2475-2485.
- [45] Mueller P, Rudin DO, Tien HT, Wescott WC, Reconstitution of cell membrane structure in vitro and its transformation into an excitable system, *Nature* (1962), 194: 979-980.

- [46] Bangham AD, Horne RW, Negative Staining of Phospholipids and Their Structural Modification by Surface-Active Agents as Observed in the Electron Microscope, *J Mol Biol* (**1964**), 8: 660-668.
- [47] Sessa G, Weissmann G, Phospholipid spherules (liposomes) as a model for biological membranes, *J Lipid Res* (**1968**), 9: 310-318.
- [48] Morales-Pennington NF, Wu J, Farkas ER, Goh SL, Konyakhina TM, Zheng JY, Webb WW, Feigenson GW, GUV preparation and imaging: minimizing artifacts, *Biochim Biophys Acta* (**2010**), 1798: 1324-1332.
- [49] Korlach J, Schwille P, Webb WW, Feigenson GW, Characterization of lipid bilayer phases by confocal microscopy and fluorescence correlation spectroscopy, *Proc Natl Acad Sci U S A* (**1999**), 96: 8461-8466.
- [50] Saalik P, Niinep A, Pae J, Hansen M, Lubenets D, Langel U, Pooga M, Penetration without cells: membrane translocation of cell-penetrating peptides in the model giant plasma membrane vesicles, *J Control Release* (**2011**), 153: 117-125.
- [51] Scott RE, Plasma membrane vesiculation: a new technique for isolation of plasma membranes, *Science* (**1976**), 194: 743-745.
- [52] Gabriel NE, Roberts MF, Spontaneous formation of stable unilamellar vesicles, *Biochemistry* (**1984**), 23: 4011-4015.
- [53] Gabriel NE, Roberts MF, Interaction of short-chain lecithin with long-chain phospholipids: characterization of vesicles that form spontaneously, *Biochemistry* (**1986**), 25: 2812-2821.
- [54] Loudet C, Diller A, Grelard A, Oda R, Dufourc EJ, Biphenyl phosphatidylcholine: a promoter of liposome deformation and bicelle collective orientation by magnetic fields, *Prog Lipid Res* (**2010**), 49: 289-297.
- [55] Ryser HJ, Hancock R, Histones and basic polyamino acids stimulate the uptake of albumin by tumor cells in culture, *Science* (**1965**), 150: 501-503.
- [56] Green M, Loewenstein PM, Autonomous functional domains of chemically synthesized human immunodeficiency virus tat trans-activator protein, *Cell* (**1988**), 55: 1179-1188.
- [57] Frankel AD, Pabo CO, Cellular uptake of the tat protein from human immunodeficiency virus, *Cell* (**1988**), 55: 1189-1193.
- [58] Milletti F, Cell-penetrating peptides: classes, origin, and current landscape, *Drug Discov Today* (**2012**), 17: 850-860.
- [59] Vives E, Brodin P, Lebleu B, A truncated HIV-1 Tat protein basic domain rapidly translocates through the plasma membrane and accumulates in the cell nucleus, *J Biol Chem* (**1997**), 272: 16010-16017.

- [60] Joliot A, Pernelle C, Deagostini-Bazin H, Prochiantz A, Antennapedia homeobox peptide regulates neural morphogenesis, *Proc Natl Acad Sci U S A* (1991), 88: 1864-1868.
- [61] Derossi D, Joliot AH, Chassaing G, Prochiantz A, The third helix of the Antennapedia homeodomain translocates through biological membranes, *J Biol Chem* (1994), 269: 10444-10450.
- [62] Fraenkel E, Pabo CO, Comparison of X-ray and NMR structures for the Antennapedia homeodomain-DNA complex, *Nat Struct Biol* (1998), 5: 692-697.
- [63] Derossi D, Calvet S, Trembleau A, Brunissen A, Chassaing G, Prochiantz A, Cell internalization of the third helix of the Antennapedia homeodomain is receptor-independent, *J Biol Chem* (1996), 271: 18188-18193.
- [64] Elmquist A, Lindgren M, Bartfai T, Langel U, VE-cadherin-derived cell-penetrating peptide, pVEC, with carrier functions, *Exp Cell Res* (2001), 269: 237-244.
- [65] Langel U, Pooga M, Kairane C, Zilmer M, Bartfai T, A galanin-mastoparan chimeric peptide activates the Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase and reverses its inhibition by ouabain, *Regul Pept* (1996), 62: 47-52.
- [66] Pooga M, Hallbrink M, Zorko M, Langel U, Cell penetration by transportan, *FASEB J* (1998), 12: 67-77.
- [67] Morris MC, Depollier J, Mery J, Heitz F, Divita G, A peptide carrier for the delivery of biologically active proteins into mammalian cells, *Nat Biotechnol* (2001), 19: 1173-1176.
- [68] Deshayes S, Heitz A, Morris MC, Charnet P, Divita G, Heitz F, Insight into the mechanism of internalization of the cell-penetrating carrier peptide Pep-1 through conformational analysis, *Biochemistry* (2004), 43: 1449-1457.
- [69] Morris MC, Vidal P, Chaloin L, Heitz F, Divita G, A new peptide vector for efficient delivery of oligonucleotides into mammalian cells, *Nucleic Acids Res* (1997), 25: 2730-2736.
- [70] Gros E, Deshayes S, Morris MC, Aldrian-Herrada G, Depollier J, Heitz F, Divita G, A non-covalent peptide-based strategy for protein and peptide nucleic acid transduction, *Biochim Biophys Acta* (2006), 1758: 384-393.
- [71] Morris MC, Deshayes S, Heitz F, Divita G, Cell-penetrating peptides: from molecular mechanisms to therapeutics, *Biol Cell* (2008), 100: 201-217.
- [72] Wender PA, Mitchell DJ, Pattabiraman K, Pelkey ET, Steinman L, Rothbard JB, The design, synthesis, and evaluation of molecules that enable or enhance cellular uptake: peptoid molecular transporters, *Proc Natl Acad Sci U S A* (2000), 97: 13003-13008.

- [73] Futaki S, Suzuki T, Ohashi W, Yagami T, Tanaka S, Ueda K, Sugiura Y, Arginine-rich peptides. An abundant source of membrane-permeable peptides having potential as carriers for intracellular protein delivery, *The Journal of biological chemistry* (2001), 276: 5836-5840.
- [74] Crombez L, Aldrian-Herrada G, Konate K, Nguyen QN, McMaster GK, Brasseur R, Heitz F, Divita G, A new potent secondary amphipathic cell-penetrating peptide for siRNA delivery into mammalian cells, *Mol Ther* (2009), 17: 95-103.
- [75] Oehlke J, Scheller A, Wiesner B, Krause E, Beyermann M, Klauschenz E, Melzig M, Bienert M, Cellular uptake of an alpha-helical amphipathic model peptide with the potential to deliver polar compounds into the cell interior non-endocytically, *Biochim Biophys Acta* (1998), 1414: 127-139.
- [76] Torchilin VP, Tat peptide-mediated intracellular delivery of pharmaceutical nanocarriers, *Adv Drug Deliv Rev* (2008), 60: 548-558.
- [77] Eguchi A, Akuta T, Okuyama H, Senda T, Yokoi H, Inokuchi H, Fujita S, Hayakawa T, Takeda K, Hasegawa M, Nakanishi M, Protein transduction domain of HIV-1 Tat protein promotes efficient delivery of DNA into mammalian cells, *J Biol Chem* (2001), 276: 26204-26210.
- [78] Thoren PE, Persson D, Isakson P, Goksor M, Onfelt A, Norden B, Uptake of analogs of penetratin, Tat(48-60) and oligoarginine in live cells, *Biochem Biophys Res Commun* (2003), 307: 100-107.
- [79] Schwarze SR, Ho A, Vocero-Akbani A, Dowdy SF, In vivo protein transduction: delivery of a biologically active protein into the mouse, *Science* (1999), 285: 1569-1572.
- [80] Wang F, Wang Y, Zhang X, Zhang W, Guo S, Jin F, Recent progress of cell-penetrating peptides as new carriers for intracellular cargo delivery, *J Control Release* (2014), 174: 126-136.
- [81] Chugh A, Eudes F, Shim YS, Cell-penetrating peptides: Nanocarrier for macromolecule delivery in living cells, *IUBMB Life* (2010), 62: 183-193.
- [82] Farkhani SM, Valizadeh A, Karami H, Mohammadi S, Sohrabi N, Badrzadeh F, Cell penetrating peptides: Efficient vectors for delivery of nanoparticles, nanocarriers, therapeutic and diagnostic molecules, *Peptides* (2014), 57C: 78-94.
- [83] Diaz-Mochon JJ, Bialy L, Watson J, Sanchez-Martin RM, Bradley M, Synthesis and cellular uptake of cell delivering PNA-peptide conjugates, *Chem Commun (Camb)* (2005), 3316-3318.
- [84] Saito G, Swanson JA, Lee KD, Drug delivery strategy utilizing conjugation via reversible disulfide linkages: role and site of cellular reducing activities, *Adv Drug Deliv Rev* (2003), 55: 199-215.



- [85] Howl J, Jones S, Farquhar M, Intracellular delivery of bioactive peptides to RBL-2H3 cells induces beta-hexosaminidase secretion and phospholipase D activation, *Chembiochem* (2003), 4: 1312-1316.
- [86] Liang JF, Yang VC, Insulin-cell penetrating peptide hybrids with improved intestinal absorption efficiency, *Biochem Biophys Res Commun* (2005), 335: 734-738.
- [87] Rydstrom A, Deshayes S, Konate K, Crombez L, Padari K, Boukhaddaoui H, Aldrian G, Pooga M, Divita G, Direct translocation as major cellular uptake for CADY self-assembling peptide-based nanoparticles, *PLoS One* (2011), 6: e25924.
- [88] Sandgren S, Cheng F, Belting M, Nuclear targeting of macromolecular polyanions by an HIV-Tat derived peptide. Role for cell-surface proteoglycans, *J Biol Chem* (2002), 277: 38877-38883.
- [89] Tyagi M, Rusnati M, Presta M, Giacca M, Internalization of HIV-I tat requires cell surface heparan sulfate proteoglycans, *J Biol Chem* (2001), 276: 3254-3261.
- [90] Ziegler A, Seelig J, Interaction of the protein transduction domain of HIV-I TAT with heparan sulfate: binding mechanism and thermodynamic parameters, *Biophys J* (2004), 86: 254-263.
- [91] Alves ID, Jiao CY, Aubry S, Aussedat B, Burlina F, Chassaing G, Sagan S, Cell biology meets biophysics to unveil the different mechanisms of penetratin internalization in cells, *Biochim Biophys Acta* (2010), 1798: 2231-2239.
- [92] Raagel H, Saalik P, Pooga M, Peptide-mediated protein delivery-which pathways are penetrable?, *Biochim Biophys Acta* (2010), 1798: 2240-2248.
- [93] Duchardt F, Fotin-Mleczek M, Schwarz H, Fischer R, Brock R, A comprehensive model for the cellular uptake of cationic cell-penetrating peptides, *Traffic* (2007), 8: 848-866.
- [94] Oehlke J, Krause E, Wiesner B, Beyermann M, Bienert M, Extensive cellular uptake into endothelial cells of an amphipathic beta-sheet forming peptide, *FEBS Lett* (1997), 415: 196-199.
- [95] Fischer R, Fotin-Mleczek M, Hufnagel H, Brock R, Break on through to the other side-biophysics and cell biology shed light on cell-penetrating peptides, *Chembiochem* (2005), 6: 2126-2142.
- [96] Epand RM, Epand RF, Arnusch CJ, Papahadjopoulos-Sternberg B, Wang G, Shai Y, Lipid clustering by three homologous arginine-rich antimicrobial peptides is insensitive to amino acid arrangement and induced secondary structure, *Biochim Biophys Acta* (2010), 1798: 1272-1280.
- [97] Walrant A, Correia I, Jiao CY, Lequin O, Bent EH, Goasdoue N, Lacombe C, Chassaing G, Sagan S, Alves ID, Different membrane behaviour and cellular uptake of three basic arginine-rich peptides, *Biochim Biophys Acta* (2011), 1808: 382-393.

- [98] Belting M, Heparan sulfate proteoglycan as a plasma membrane carrier, *Trends Biochem Sci* (2003), 28: 145-151.
- [99] Nakase I, Tadokoro A, Kawabata N, Takeuchi T, Katoh H, Hiramoto K, Negishi M, Nomizu M, Sugiura Y, Futaki S, Interaction of arginine-rich peptides with membrane-associated proteoglycans is crucial for induction of actin organization and macropinocytosis, *Biochemistry* (2007), 46: 492-501.
- [100] Jiao CY, Delaroche D, Burlina F, Alves ID, Chassaing G, Sagan S, Translocation and endocytosis for cell-penetrating peptide internalization, *J Biol Chem* (2009), 284: 33957-33965.
- [101] Mishra A, Gordon VD, Yang L, Coridan R, Wong GC, HIV TAT forms pores in membranes by inducing saddle-splay curvature: potential role of bidentate hydrogen bonding, *Angew Chem Int Ed Engl* (2008), 47: 2986-2989.
- [102] Rothbard JB, Jessop TC, Wender PA, Adaptive translocation: the role of hydrogen bonding and membrane potential in the uptake of guanidinium-rich transporters into cells, *Adv Drug Deliv Rev* (2005), 57: 495-504.
- [103] Bechara C, Pallerla M, Zaltsman Y, Burlina F, Alves ID, Lequin O, Sagan S, Tryptophan within basic peptide sequences triggers glycosaminoglycan-dependent endocytosis, *FASEB J* (2013), 27: 738-749.
- [104] Verdurmen WP, Wallbrecher R, Schmidt S, Eilander J, Bovee-Geurts P, Fanghanel S, Burck J, Wadhvani P, Ulrich AS, Brock R, Cell surface clustering of heparan sulfate proteoglycans by amphipathic cell-penetrating peptides does not contribute to uptake, *J Control Release* (2013), 170: 83-91.
- [105] Berlose JP, Convert O, Derossi D, Brunissen A, Chassaing G, Conformational and associative behaviours of the third helix of antennapedia homeodomain in membrane-mimetic environments, *Eur J Biochem* (1996), 242: 372-386.
- [106] Thoren PE, Persson D, Lincoln P, Norden B, Membrane destabilizing properties of cell-penetrating peptides, *Biophys Chem* (2005), 114: 169-179.
- [107] Alves ID, Goasdoue N, Correia I, Aubry S, Galanth C, Sagan S, Lavielle S, Chassaing G, Membrane interaction and perturbation mechanisms induced by two cationic cell penetrating peptides with distinct charge distribution, *Biochim Biophys Acta* (2008), 1780: 948-959.
- [108] Islam MZ, Ariyama H, Alam JM, Yamazaki M, Entry of cell-penetrating peptide transportan 10 into a single vesicle by translocating across lipid membrane and its induced pores, *Biochemistry* (2014), 53: 386-396.
- [109] Jones SW, Christison R, Bundell K, Voyce CJ, Brockbank SM, Newham P, Lindsay MA, Characterisation of cell-penetrating peptide-mediated peptide delivery, *Br J Pharmacol* (2005), 145: 1093-1102.

- [110] Richard JP, Melikov K, Brooks H, Prevot P, Lebleu B, Chernomordik LV, Cellular uptake of unconjugated TAT peptide involves clathrin-dependent endocytosis and heparan sulfate receptors, *J Biol Chem* (2005), 280: 15300-15306.
- [111] Kerr MC, Teasdale RD, Defining macropinocytosis, *Traffic* (2009), 10: 364-371.
- [112] Nakase I, Niwa M, Takeuchi T, Sonomura K, Kawabata N, Koike Y, Takehashi M, Tanaka S, Ueda K, Simpson JC, Jones AT, Sugiura Y, Futaki S, Cellular uptake of arginine-rich peptides: roles for macropinocytosis and actin rearrangement, *Mol Ther* (2004), 10: 1011-1022.
- [113] Wadia JS, Stan RV, Dowdy SF, Transducible TAT-HA fusogenic peptide enhances escape of TAT-fusion proteins after lipid raft macropinocytosis, *Nat Med* (2004), 10: 310-315.
- [114] Ter-Avetisyan G, Tunnemann G, Nowak D, Nitschke M, Herrmann A, Drab M, Cardoso MC, Cell entry of arginine-rich peptides is independent of endocytosis, *J Biol Chem* (2009), 284: 3370-3378.
- [115] Rothbard JB, Jessop TC, Lewis RS, Murray BA, Wender PA, Role of membrane potential and hydrogen bonding in the mechanism of translocation of guanidinium-rich peptides into cells, *J Am Chem Soc* (2004), 126: 9506-9507.
- [116] Joliot AH, Triller A, Volovitch M, Pernelle C, Prochiantz A, alpha-2,8-Polysialic acid is the neuronal surface receptor of antennapedia homeobox peptide, *New Biol* (1991), 3: 1121-1134.
- [117] Tiriveedhi V, Butko P, A fluorescence spectroscopy study on the interactions of the TAT-PTD peptide with model lipid membranes, *Biochemistry* (2007), 46: 3888-3895.
- [118] Ziegler A, Blatter XL, Seelig A, Seelig J, Protein transduction domains of HIV-1 and SIV TAT interact with charged lipid vesicles. Binding mechanism and thermodynamic analysis, *Biochemistry* (2003), 42: 9185-9194.
- [119] Herce HD, Garcia AE, Molecular dynamics simulations suggest a mechanism for translocation of the HIV-1 TAT peptide across lipid membranes, *Proc Natl Acad Sci U S A* (2007), 104: 20805-20810.
- [120] Herce HD, Garcia AE, Litt J, Kane RS, Martin P, Enrique N, Rebolledo A, Milesi V, Arginine-rich peptides destabilize the plasma membrane, consistent with a pore formation translocation mechanism of cell-penetrating peptides, *Biophys J* (2009), 97: 1917-1925.
- [121] Esbjorner EK, Lincoln P, Norden B, Counterion-mediated membrane penetration: cationic cell-penetrating peptides overcome Born energy barrier by ion-pairing with phospholipids, *Biochim Biophys Acta* (2007), 1768: 1550-1558.

- [122] Guterstam P, Madani F, Hirose H, Takeuchi T, Futaki S, El Andaloussi S, Graslund A, Langel U, Elucidating cell-penetrating peptide mechanisms of action for membrane interaction, cellular uptake, and translocation utilizing the hydrophobic counter-anion pyrenebutyrate, *Biochim Biophys Acta* (2009), 1788: 2509-2517.
- [123] Maiolo JR, Ferrer M, Ottinger EA, Effects of cargo molecules on the cellular uptake of arginine-rich cell-penetrating peptides, *Biochim Biophys Acta* (2005), 1712: 161-172.
- [124] Zorko M, Langel U, Cell-penetrating peptides: mechanism and kinetics of cargo delivery, *Adv Drug Deliv Rev* (2005), 57: 529-545.
- [125] Tunnemann G, Martin RM, Haupt S, Patsch C, Edenhofer F, Cardoso MC, Cargo-dependent mode of uptake and bioavailability of TAT-containing proteins and peptides in living cells, *FASEB J* (2006), 20: 1775-1784.
- [126] Holm T, Johansson H, Lundberg P, Pooga M, Lindgren M, Langel U, Studying the uptake of cell-penetrating peptides, *Nat Protoc* (2006), 1: 1001-1005.
- [127] Garcia-Echeverria C, Jiang L, Ramsey TM, Sharma SK, Chen YP, A new Antennapedia-derived vector for intracellular delivery of exogenous compounds, *Bioorg Med Chem Lett* (2001), 11: 1363-1366.
- [128] Padari K, Saalik P, Hansen M, Koppel K, Raid R, Langel U, Pooga M, Cell transduction pathways of transportans, *Bioconjug Chem* (2005), 16: 1399-1410.
- [129] Burlina F, Sagan S, Bolbach G, Chassaing G, A direct approach to quantification of the cellular uptake of cell-penetrating peptides using MALDI-TOF mass spectrometry, *Nat Protoc* (2006), 1: 200-205.
- [130] El Andaloussi S, Guterstam P, Langel U, Assessing the delivery efficacy and internalization route of cell-penetrating peptides, *Nat Protoc* (2007), 2: 2043-2047.
- [131] Aroui S, Brahim S, De Waard M, Breard J, Kenani A, Efficient induction of apoptosis by doxorubicin coupled to cell-penetrating peptides compared to unconjugated doxorubicin in the human breast cancer cell line MDA-MB 231, *Cancer Lett* (2009), 285: 28-38.
- [132] Holm T, Andaloussi SE, Langel U, Comparison of CPP uptake methods, *Methods Mol Biol* (2011), 683: 207-217.
- [133] Abes S, Williams D, Prevot P, Thierry A, Gait MJ, Lebleu B, Endosome trapping limits the efficiency of splicing correction by PNA-oligolysine conjugates, *J Control Release* (2006), 110: 595-604.
- [134] Liu S, Radiolabeled cyclic RGD peptides as integrin  $\alpha(v)\beta(3)$ -targeted radiotracers: maximizing binding affinity via bivalency, *Bioconjug Chem* (2009), 20: 2199-2213.
- [135] Ruoslahti E, Pierschbacher MD, New perspectives in cell adhesion: RGD and integrins, *Science* (1987), 238: 491-497.

- [136] Wang XL, Xu R, Lu ZR, A peptide-targeted delivery system with pH-sensitive amphiphilic cell membrane disruption for efficient receptor-mediated siRNA delivery, *J Control Release* (2009), 134: 207-213.
- [137] Okarvi SM, Peptide-based radiopharmaceuticals and cytotoxic conjugates: potential tools against cancer, *Cancer Treat Rev* (2008), 34: 13-26.
- [138] Schally AV, Nagy A, New approaches to treatment of various cancers based on cytotoxic analogs of LHRH, somatostatin and bombesin, *Life Sci* (2003), 72: 2305-2320.
- [139] Nakase I, Konishi Y, Ueda M, Saji H, Futaki S, Accumulation of arginine-rich cell-penetrating peptides in tumors and the potential for anticancer drug delivery in vivo, *J Control Release* (2012), 159: 181-188.
- [140] Kondo E, Saito K, Tashiro Y, Kamide K, Uno S, Furuya T, Mashita M, Nakajima K, Tsumuraya T, Kobayashi N, Nishibori M, Tanimoto M, Matsushita M, Tumour lineage-homing cell-penetrating peptides as anticancer molecular delivery systems, *Nat Commun* (2012), 3: 951.
- [141] Richter S, Bouvet V, Wuest M, Bergmann R, Steinbach J, Pietzsch J, Neundorff I, Wuest F, (18)F-Labeled phosphopeptide-cell-penetrating peptide dimers with enhanced cell uptake properties in human cancer cells, *Nucl Med Biol* (2012), 39: 1202-1212.
- [142] Frey B, Gaipf US, The immune functions of phosphatidylserine in membranes of dying cells and microvesicles, *Semin Immunopathol* (2011), 33: 497-516.
- [143] Hendrich AB, Michalak K, Lipids as a target for drugs modulating multidrug resistance of cancer cells, *Curr Drug Targets* (2003), 4: 23-30.
- [144] Ran S, Downes A, Thorpe PE, Increased exposure of anionic phospholipids on the surface of tumor blood vessels, *Cancer Res* (2002), 62: 6132-6140.
- [145] Matsuda K, Maruyama H, Guo F, Kleeff J, Itakura J, Matsumoto Y, Lander AD, Korc M, Glypican-1 is overexpressed in human breast cancer and modulates the mitogenic effects of multiple heparin-binding growth factors in breast cancer cells, *Cancer Res* (2001), 61: 5562-5569.
- [146] Afratis N, Gialeli C, Nikitovic D, Tsegenidis T, Karousou E, Theocharis AD, Pavao MS, Tzanakakis GN, Karamanos NK, Glycosaminoglycans: key players in cancer cell biology and treatment, *FEBS J* (2012), 279: 1177-1197.
- [147] Knelson EH, Nee JC, Blobe GC, Heparan sulfate signaling in cancer, *Trends Biochem Sci* (2014).
- [148] Ziegler A, Seelig J, Contributions of glycosaminoglycan binding and clustering to the biological uptake of the nonamphipathic cell-penetrating peptide VR9, *Biochemistry* (2011), 50: 4650-4664.
- [149] Mitchell DJ, Kim DT, Steinman L, Fathman CG, Rothbard JB, Polyarginine enters cells more efficiently than other polycationic homopolymers, *J Pept Res* (2000), 56: 318-325.

- [150] Amand HL, Rydberg HA, Fornander LH, Lincoln P, Norden B, Esbjorner EK, Cell surface binding and uptake of arginine- and lysine-rich penetratin peptides in absence and presence of proteoglycans, *Biochim Biophys Acta* (2012), 1818: 2669-2678.
- [151] Mishra A Chapter Five - Structural Transitions in Lipid Membranes: Mechanism for Cell-Penetrating Peptides. In *Advances in Planar Lipid Bilayers and Liposomes*, Aleš I, Chandrashekar VK (eds), Vol. Volume 19 (2014), pp 103-137. Academic Press
- [152] Splith K, Neundorff I, Antimicrobial peptides with cell-penetrating peptide properties and vice versa, *Eur Biophys J* (2011), 40: 387-397.
- [153] Garibotto FM, Garro AD, Rodriguez AM, Raimondi M, Zacchino SA, Perczel A, Somlai C, Penke B, Enriz RD, Penetratin analogues acting as antifungal agents, *Eur J Med Chem* (2011), 46: 370-377.
- [154] Jung HJ, Park Y, Hahm KS, Lee DG, Biological activity of Tat (47-58) peptide on human pathogenic fungi, *Biochem Biophys Res Commun* (2006), 345: 222-228.
- [155] Gifford JL, Hunter HN, Vogel HJ, Lactoferricin: a lactoferrin-derived peptide with antimicrobial, antiviral, antitumor and immunological properties, *Cell Mol Life Sci* (2005), 62: 2588-2598.
- [156] Gonzalez-Chavez SA, Arevalo-Gallegos S, Rascon-Cruz Q, Lactoferrin: structure, function and applications, *Int J Antimicrob Agents* (2009), 33: 301 e301-308.
- [157] Otvos L, Jr., Cudic M, Chua BY, Deliyannis G, Jackson DC, An insect antibacterial peptide-based drug delivery system, *Mol Pharm* (2004), 1: 220-232.
- [158] Wang Q, Hong G, Johnson GR, Pachter R, Cheung MS, Biophysical properties of membrane-active peptides based on micelle modeling: a case study of cell-penetrating and antimicrobial peptides, *J Phys Chem B* (2010), 114: 13726-13735.
- [159] Joanne P, Galanth C, Goasdoue N, Nicolas P, Sagan S, Lavielle S, Chassaing G, El Amri C, Alves ID, Lipid reorganization induced by membrane-active peptides probed using differential scanning calorimetry, *Biochim Biophys Acta* (2009), 1788: 1772-1781.
- [160] Staubitz P, Peschel A, Nieuwenhuizen WF, Otto M, Gotz F, Jung G, Jack RW, Structure-function relationships in the tryptophan-rich, antimicrobial peptide indolicidin, *J Pept Sci* (2001), 7: 552-564.
- [161] Henriques ST, Melo MN, Castanho MA, Cell-penetrating peptides and antimicrobial peptides: how different are they?, *Biochem J* (2006), 399: 1-7.
- [162] Castanho M Membrane-Active Peptides: What after Babylon? In *Membrane Active Peptides. Methods and Results on Structure and Function*, Castanho M (ed), (2009), pp 11-28. La Jolla
- [163] Derossi D, Chassaing G, Prochiantz A, Trojan peptides: the penetratin system for intracellular delivery, *Trends Cell Biol* (1998), 8: 84-87.

- [164] Lamaziere A, Burlina F, Wolf C, Chassaing G, Trugnan G, Ayala-Sanmartin J, Non-metabolic membrane tubulation and permeability induced by bioactive peptides, *PLoS One* (2007), 2: e201.
- [165] Williams EJ, Dunican DJ, Green PJ, Howell FV, Derossi D, Walsh FS, Doherty P, Selective inhibition of growth factor-stimulated mitogenesis by a cell-permeable Grb2-binding peptide, *J Biol Chem* (1997), 272: 22349-22354.
- [166] Delaroche D, Aussedat B, Aubry S, Chassaing G, Burlina F, Clodic G, Bolbach G, Lavielle S, Sagan S, Tracking a new cell-penetrating (W/R) nonapeptide, through an enzyme-stable mass spectrometry reporter tag, *Anal Chem* (2007), 79: 1932-1938.
- [167] Delaroche D, Cantrelle FX, Subra F, Van Heijenoort C, Guittet E, Jiao CY, Blanchoin L, Chassaing G, Lavielle S, Auclair C, Sagan S, Cell-penetrating peptides with intracellular actin-remodeling activity in malignant fibroblasts, *J Biol Chem* (2010), 285: 7712-7721.
- [168] Zemel A, Fattal DR, Ben-Shaul A, Energetics and self-assembly of amphipathic peptide pores in lipid membranes, *Biophys J* (2003), 84: 2242-2255.
- [169] Barany-Wallje E, Keller S, Serowy S, Geibel S, Pohl P, Bienert M, Dathe M, A critical reassessment of penetratin translocation across lipid membranes, *Biophys J* (2005), 89: 2513-2521.
- [170] Walrant A, Vogel A, Correia I, Lequin O, Olausson BE, Desbat B, Sagan S, Alves ID, Membrane interactions of two arginine-rich peptides with different cell internalization capacities, *Biochim Biophys Acta* (2012), 1818: 1755-1763.
- [171] Magzoub M, Eriksson LE, Graslund A, Conformational states of the cell-penetrating peptide penetratin when interacting with phospholipid vesicles: effects of surface charge and peptide concentration, *Biochim Biophys Acta* (2002), 1563: 53-63.
- [172] Woody RW, Contributions of tryptophan side chains to the far-ultraviolet circular dichroism of proteins, *Eur Biophys J* (1994), 23: 253-262.
- [173] Ladokhin AS, Selsted ME, White SH, CD spectra of indolicidin antimicrobial peptides suggest turns, not polyproline helix, *Biochemistry* (1999), 38: 12313-12319.
- [174] Andrushchenko VV, Vogel HJ, Prenner EJ, Solvent-dependent structure of two tryptophan-rich antimicrobial peptides and their analogs studied by FTIR and CD spectroscopy, *Biochim Biophys Acta* (2006), 1758: 1596-1608.
- [175] Lecorche P, Walrant A, Burlina F, Dutot L, Sagan S, Mallet JM, Desbat B, Chassaing G, Alves ID, Lavielle S, Cellular uptake and biophysical properties of galactose and/or tryptophan containing cell-penetrating peptides, *Biochim Biophys Acta* (2012), 1818: 448-457.
- [176] Binder H, Lindblom G, Charge-dependent translocation of the Trojan peptide penetratin across lipid membranes, *Biophys J* (2003), 85: 982-995.

- [177] Persson D, Thoren PE, Herner M, Lincoln P, Norden B, Application of a novel analysis to measure the binding of the membrane-translocating peptide penetratin to negatively charged liposomes, *Biochemistry* (2003), 42: 421-429.
- [178] Ziegler A, Seelig J, Binding and clustering of glycosaminoglycans: a common property of mono- and multivalent cell-penetrating compounds, *Biophys J* (2008), 94: 2142-2149.
- [179] Chan DI, Prenner EJ, Vogel HJ, Tryptophan- and arginine-rich antimicrobial peptides: structures and mechanisms of action, *Biochim Biophys Acta* (2006), 1758: 1184-1202.
- [180] Polozov IV, Anantharamaiah GM, Segrest JP, Epand RM, Osmotically induced membrane tension modulates membrane permeabilization by class L amphipathic helical peptides: nucleation model of defect formation, *Biophys J* (2001), 81: 949-959.
- [181] Yandek LE, Pokorny A, Floren A, Knoelke K, Langel U, Almeida PF, Mechanism of the cell-penetrating peptide transportan 10 permeation of lipid bilayers, *Biophys J* (2007), 92: 2434-2444.
- [182] Lopez CF, Nielsen SO, Srinivas G, Degrado WF, Klein ML, Probing Membrane Insertion Activity of Antimicrobial Polymers via Coarse-grain Molecular Dynamics, *J Chem Theory Comput* (2006), 2: 649-655.
- [183] Leontiadou H, Mark AE, Marrink SJ, Antimicrobial peptides in action, *J Am Chem Soc* (2006), 128: 12156-12161.
- [184] Hinch DK, Crowe JH, The lytic activity of the bee venom peptide melittin is strongly reduced by the presence of negatively charged phospholipids or chloroplast galactolipids in the membranes of phosphatidylcholine large unilamellar vesicles, *Biochim Biophys Acta* (1996), 1284: 162-170.
- [185] Lamaziere A, Wolf C, Lambert O, Chassaing G, Trugnan G, Ayala-Sanmartin J, The homeodomain derived peptide Penetratin induces curvature of fluid membrane domains, *PLoS One* (2008), 3: e1938.
- [186] Lamaziere A, Maniti O, Wolf C, Lambert O, Chassaing G, Trugnan G, Ayala-Sanmartin J, Lipid domain separation, bilayer thickening and pearling induced by the cell penetrating peptide penetratin, *Biochim Biophys Acta* (2010), 1798: 2223-2230.
- [187] Lichtenberg D, Freire E, Schmidt CF, Barenholz Y, Felgner PL, Thompson TE, Effect of surface curvature on stability, thermodynamic behavior, and osmotic activity of dipalmitoylphosphatidylcholine single lamellar vesicles, *Biochemistry* (1981), 20: 3462-3467.
- [188] Zhang YP, Lewis RN, Hodges RS, McElhaney RN, Interaction of a peptide model of a hydrophobic transmembrane alpha-helical segment of a membrane protein with phosphatidylcholine bilayers: differential scanning calorimetric and FTIR spectroscopic studies, *Biochemistry* (1992), 31: 11579-11588.



- [189] Thennarasu S, Tan A, Penumatchu R, Shelburne CE, Heyl DL, Ramamoorthy A, Antimicrobial and membrane disrupting activities of a peptide derived from the human cathelicidin antimicrobial peptide LL37, *Biophys J* (2010), 98: 248-257.
- [190] Epand RF, Wang G, Berno B, Epand RM, Lipid segregation explains selective toxicity of a series of fragments derived from the human cathelicidin LL-37, *Antimicrob Agents Chemother* (2009), 53: 3705-3714.
- [191] Epand RF, Schmitt MA, Gellman SH, Epand RM, Role of membrane lipids in the mechanism of bacterial species selective toxicity by two alpha/beta-antimicrobial peptides, *Biochim Biophys Acta* (2006), 1758: 1343-1350.
- [192] Magzoub M, Eriksson LE, Graslund A, Comparison of the interaction, positioning, structure induction and membrane perturbation of cell-penetrating peptides and non-translocating variants with phospholipid vesicles, *Biophys Chem* (2003), 103: 271-288.
- [193] Lensink MF, Christiaens B, Vandekerckhove J, Prochiantz A, Rosseneu M, Penetratin-membrane association: W48/R52/W56 shield the peptide from the aqueous phase, *Biophys J* (2005), 88: 939-952.
- [194] Herbig ME, Fromm U, Leuenberger J, Krauss U, Beck-Sickinger AG, Merkle HP, Bilayer interaction and localization of cell penetrating peptides with model membranes: a comparative study of a human calcitonin (hCT)-derived peptide with pVEC and pAntp(43-58), *Biochim Biophys Acta* (2005), 1712: 197-211.
- [195] Thoren PE, Persson D, Esbjorner EK, Goksor M, Lincoln P, Norden B, Membrane binding and translocation of cell-penetrating peptides, *Biochemistry* (2004), 43: 3471-3489.
- [196] De Kroon AI, Soekarjo MW, De Gier J, De Kruijff B, The role of charge and hydrophobicity in peptide-lipid interaction: a comparative study based on tryptophan fluorescence measurements combined with the use of aqueous and hydrophobic quenchers, *Biochemistry* (1990), 29: 8229-8240.
- [197] Respondek M, Madl T, Gobl C, Golser R, Zangger K, Mapping the orientation of helices in micelle-bound peptides by paramagnetic relaxation waves, *J Am Chem Soc* (2007), 129: 5228-5234.
- [198] Salamon Z, Lindblom G, Tollin G, Plasmon-waveguide resonance and impedance spectroscopy studies of the interaction between penetratin and supported lipid bilayer membranes, *Biophys J* (2003), 84: 1796-1807.
- [199] Salamon Z, Tollin G, Optical anisotropy in lipid bilayer membranes: coupled plasmon-waveguide resonance measurements of molecular orientation, polarizability, and shape, *Biophys J* (2001), 80: 1557-1567.
- [200] Slater JL, Huang CH, Interdigitated bilayer membranes, *Prog Lipid Res* (1988), 27: 325-359.

- [201] Mecke A, Lee DK, Ramamoorthy A, Orr BG, Banaszak Holl MM, Membrane thinning due to antimicrobial peptide binding: an atomic force microscopy study of MSI-78 in lipid bilayers, *Biophys J* (2005), 89: 4043-4050.
- [202] Heller WT, Waring AJ, Lehrer RI, Harroun TA, Weiss TM, Yang L, Huang HW, Membrane thinning effect of the beta-sheet antimicrobial protegrin, *Biochemistry* (2000), 39: 139-145.
- [203] Garidel P, Blume A, Interaction of Alkaline Earth Cations with the Negatively Charged Phospholipid 1,2-Dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphoglycerol: A Differential Scanning and Isothermal Titration Calorimetric Study, *Langmuir* (1999), 15: 9.
- [204] Christiaens B, Symoens S, Verheyden S, Engelborghs Y, Joliot A, Prochiantz A, Vandekerckhove J, Rosseneu M, Vanloo B, Tryptophan fluorescence study of the interaction of penetratin peptides with model membranes, *Eur J Biochem* (2002), 269: 2918-2926.
- [205] Drin G, Cottin S, Blanc E, Rees AR, Temsamani J, Studies on the internalization mechanism of cationic cell-penetrating peptides, *J Biol Chem* (2003), 278: 31192-31201.
- [206] Lee HL, Dubikovskaya EA, Hwang H, Semyonov AN, Wang H, Jones LR, Twieg RJ, Moerner WE, Wender PA, Single-molecule motions of oligoarginine transporter conjugates on the plasma membrane of Chinese hamster ovary cells, *J Am Chem Soc* (2008), 130: 9364-9370.
- [207] Christiaens B, Grooten J, Reusens M, Joliot A, Goethals M, Vandekerckhove J, Prochiantz A, Rosseneu M, Membrane interaction and cellular internalization of penetratin peptides, *Eur J Biochem* (2004), 271: 1187-1197.
- [208] Henriques ST, Castanho MA, Environmental factors that enhance the action of the cell penetrating peptide pep-1 A spectroscopic study using lipidic vesicles, *Biochim Biophys Acta* (2005), 1669: 75-86.
- [209] Santos NC, Prieto M, Castanho MA, Quantifying molecular partition into model systems of biomembranes: an emphasis on optical spectroscopic methods, *Biochim Biophys Acta* (2003), 1612: 123-135.
- [210] Melo MN, Castanho MA, Omiganan interaction with bacterial membranes and cell wall models. Assigning a biological role to saturation, *Biochim Biophys Acta* (2007), 1768: 1277-1290.
- [211] Matos PM, Franquelim HG, Castanho MA, Santos NC, Quantitative assessment of peptide-lipid interactions. Ubiquitous fluorescence methodologies, *Biochim Biophys Acta* (2010), 1798: 1999-2012.
- [212] Rodrigues M, Santos A, de la Torre BG, Radis-Baptista G, Andreu D, Santos NC, Molecular characterization of the interaction of crotamine-derived nucleolar targeting peptides with lipid membranes, *Biochim Biophys Acta* (2012), 1818: 2707-2717.

- [213] Walrant A, Matheron L, Cribier S, Chaignepain S, Jobin ML, Sagan S, Alves ID, Direct translocation of cell penetrating peptides in liposomes: a combined mass spectrometry quantification and fluorescence detection study, *Anal Biochem* (2013), 438.
- [214] Mager I, Eiriksdottir E, Langel K, El Andaloussi S, Langel U, Assessing the uptake kinetics and internalization mechanisms of cell-penetrating peptides using a quenched fluorescence assay, *Biochim Biophys Acta* (2010), 1798: 338-343.
- [215] Bechara C, Sagan S, Cell-penetrating peptides: 20 years later, where do we stand?, *FEBS Lett* (2013), 587: 1693-1702.
- [216] Nishihara M, Perret F, Takeuchi T, Futaki S, Lazar AN, Coleman AW, Sakai N, Matile S, Arginine magic with new counterions up the sleeve, *Org Biomol Chem* (2005), 3: 1659-1669.
- [217] Rydberg HA, Kunze A, Carlsson N, Altgarde N, Svedhem S, Norden B, Peptide-membrane interactions of arginine-tryptophan peptides probed using quartz crystal microbalance with dissipation monitoring, *Eur Biophys J* (2014), 43: 12.
- [218] Rydberg HA, Matson M, Amand HL, Esbjorner EK, Norden B, Effects of Tryptophan Content and Backbone Spacing on the Uptake Efficiency of Cell-Penetrating Peptides, *Biochemistry* (2012), 51: 5531-5539.
- [219] Deshayes S, Plenat T, Aldrian-Herrada G, Divita G, Le Grimmellec C, Heitz F, Primary amphipathic cell-penetrating peptides: structural requirements and interactions with model membranes, *Biochemistry* (2004), 43: 7698-7706.
- [220] Cordier C, Boutimah F, Bourdeloux M, Dupuy F, Met E, Alberti P, Loll F, Chassaing G, Burlina F, Saison-Behmoaras TE, Delivery of antisense peptide nucleic acids to cells by conjugation with small arginine-rich cell-penetrating peptide (R/W)9, *PLoS One* (2014), 9: e104999.
- [221] Pott T, Dufourc EJ, Action of melittin on the DPPC-cholesterol liquid-ordered phase: a solid state <sup>2</sup>H- and <sup>31</sup>P-NMR study, *Biophys J* (1995), 68: 965-977.
- [222] Salamon Z, Tollin G, Alves I, Hruby V, Chapter 6. Plasmon resonance methods in membrane protein biology applications to GPCR signaling, *Methods Enzymol* (2009), 461: 123-146.
- [223] Alves ID, Cowell SM, Salamon Z, Devanathan S, Tollin G, Hruby VJ, Different structural states of the proteolipid membrane are produced by ligand binding to the human delta-opioid receptor as shown by plasmon-waveguide resonance spectroscopy, *Mol Pharmacol* (2004), 65: 1248-1257.
- [224] Salamon Z, Tollin G, Graphical analysis of mass and anisotropy changes observed by plasmon-waveguide resonance spectroscopy can provide useful insights into membrane protein function, *Biophys J* (2004), 86: 2508-2516.

- [225] Alves ID, Correia I, Jiao CY, Sachon E, Sagan S, Lavielle S, Tollin G, Chassaing G, The interaction of cell-penetrating peptides with lipid model systems and subsequent lipid reorganization: thermodynamic and structural characterization, *J Pept Sci* (2009), 15: 200-209.
- [226] Devanathan S, Salamon Z, Tollin G, Fitch J, Meyer TE, Cusanovich MA, Binding of oxidized and reduced cytochrome c2 to photosynthetic reaction centers: plasmon-waveguide resonance spectroscopy, *Biochemistry* (2004), 43: 16405-16415.
- [227] Jablonski A, Über den Mechanismus der Photolumineszenz von Farbstoffphosphoren., *Zeitschrift für Physik* (1935), 94: 38–46.
- [228] Lakowicz JR *Principles of Fluorescence Spectroscopy* (2006): Springer Science.
- [229] Rouser G, Fkeischer S, Yamamoto A, Two dimensional thin layer chromatographic separation of polar lipids and determination of phospholipids by phosphorus analysis of spots, *Lipids* (1970), 5: 494-496.
- [230] Ladokhin AS, Holloway PW, Kostrzhevskaya EG, Distribution analysis of membrane penetration of proteins by depth-dependent fluorescence quenching, *J Fluoresc* (1993), 3: 195-197.
- [231] Ladokhin AS, Distribution analysis of depth-dependent fluorescence quenching in membranes: a practical guide, *Methods Enzymol* (1997), 278: 462-473.
- [232] Chattopadhyay A, London E, Parallax method for direct measurement of membrane penetration depth utilizing fluorescence quenching by spin-labeled phospholipids, *Biochemistry* (1987), 26: 39-45.
- [233] Abrams FS, London E, Extension of the parallax analysis of membrane penetration depth to the polar region of model membranes: use of fluorescence quenching by a spin-label attached to the phospholipid polar headgroup, *Biochemistry* (1993), 32: 10826-10831.
- [234] Abrams FS, London E, Calibration of the parallax fluorescence quenching method for determination of membrane penetration depth: refinement and comparison of quenching by spin-labeled and brominated lipids, *Biochemistry* (1992), 31: 5312-5322.
- [235] Castano S, Desbat B, Structure and orientation study of fusion peptide FP23 of gp41 from HIV-1 alone or inserted into various lipid membrane models (mono-, bi- and multi-layers) by FT-IR spectroscopies and Brewster angle microscopy, *Biochim Biophys Acta* (2005), 1715: 81-95.
- [236] Goormaghtigh E, Raussens V, Ruyschaert JM, Attenuated total reflection infrared spectroscopy of proteins and lipids in biological membranes, *Biochim Biophys Acta* (1999), 1422: 105-185.
- [237] Goormaghtigh E, Cabiaux V, Ruyschaert JM, Secondary structure and dosage of soluble and membrane proteins by attenuated total reflection Fourier-transform infrared spectroscopy on hydrated films, *Eur J Biochem* (1990), 193: 409-420.





# Publications

- **M.L. Jobin**, P. Bonnafeous, H. Temsamani, F. Dole, A. Grelard, E.J. Dufourc, I.D. Alves, The enhanced membrane interaction and perturbation of a cell penetrating peptide in the presence of anionic lipids: Toward an understanding of its selectivity for cancer cells, (2013) *BBA Biomemb.*, 1828:1457-1470.
- **M.L. Jobin**, I.D. Alves. On the importance of electrostatic interactions between cell penetrating peptides with membranes: a pathway towards tumor cell selectivity? (Août 2014, *Biochimie*)
- **M.L. Jobin**, M. Blanchet, S. Henry, S. Chaignepain, C. Manigand, S. Castano, S. Lecomte, F.Burlina, S. Sagan, I.D. Alves, The role of tryptophans on the cellular uptake and membrane interaction of arginine-rich cell penetrating peptides (Juillet 2014, *BBA Biomemb.*, en révision).



# The enhanced membrane interaction and perturbation of a cell penetrating peptide in the presence of anionic lipids: Toward an understanding of its selectivity for cancer cells

Marie-Lise Jobin <sup>a</sup>, Pierre Bonnafous <sup>a</sup>, Hamza Temsamani <sup>a</sup>, François Dole <sup>b</sup>, Axelle Grélard <sup>a</sup>, Erick J. Dufourc <sup>a</sup>, Isabel D. Alves <sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> CBMN-UMR 5248 CNRS, Université de Bordeaux, IPB, Allée Geoffroy St. Hilaire, 33600 Pessac, France

<sup>b</sup> CRPP, Centre de Recherche Paul Pascal, 115 Avenue Schweitzer, 33600 Pessac, France

## ARTICLE INFO

### Article history:

Received 10 December 2012

Received in revised form 29 January 2013

Accepted 15 February 2013

Available online 24 February 2013

### Keywords:

Cell penetrating peptide

Peptide/lipid interaction

Lipid model system

Anticancer activity

## ABSTRACT

Cell penetrating peptides (CPPs) are usually short, highly cationic peptides that are capable of crossing the cell membrane and transport cargos of varied size and nature in cells by energy- and receptor-independent mechanisms. An additional potential is the newly discovered anti-tumor activity of certain CPPs, including RW16 (RRWRRWWRRWRRWRR) which is derived from penetratin and is investigated here. The use of CPPs in therapeutics, diagnosis and potential application as anti-tumor agents increases the necessity of understanding their mode of action, a subject yet not totally understood. With this in mind, the membrane interaction and perturbation mechanisms of RW16 with both zwitterionic and anionic lipid model systems (used as representative models of healthy vs tumor cells) were investigated using a large panoply of biophysical techniques. It was shown that RW16 autoassociates and that its oligomerization state highly influences its membrane interaction. Overall a stronger association and perturbation of anionic membranes was observed, especially in the presence of oligomeric peptide, when compared to zwitterionic ones. This might explain, at least in part, the anti-tumor activity and so the selective interaction with cancer cells whose membranes have been shown to be especially anionic. Hydrophobic contacts between the peptide and lipids were also shown to play an important role in the interaction. That probably results from the tryptophan insertion into the fatty acid lipid area following a peptide flip after the first electrostatic recognition. A model is presented that reflects the ensemble of results.

© 2013 Elsevier B.V. All rights reserved.

## 1. Introduction

Cell-penetrating peptides are short peptides that have the ability to translocate into cells in an energy- and receptor-independent manner. CPPs are proven to be vehicles for the intracellular delivery of macromolecules such as oligonucleotides, peptides and proteins, nano-particles and liposomes [1]. Therefore these molecules present a great potential in therapeutics and diagnosis. Indeed, the number of applications using CPPs is quickly increasing, with so far more than 300 studies from in vitro to in vivo using CPP-based strategies [2–6]. Since their discovery

in the 1990s an important number of research groups have focused in the understanding of their mode of action with the final attempt of improving their internalization and specificity. It is now mostly agreed that their uptake occurs through both endocytotic and non-endocytotic pathways but the molecular requirements for an efficient internalization are not fully understood [7]. It appears that their uptake ability depends on their amino acid sequence and spacing [8]. Despite their uptake being endocytotic or not, the first barrier that these peptides encounter is the plasma membrane which prevents direct translocation of macromolecules.

Herein, we have focused in the understanding of the membrane interaction and perturbation by a CPP derived from penetratin SAR (structure–activity relationship) studies. The peptide is RW16 (RRWRRWWRRWRRWRR), a 16 residue amphipathic peptide shown to be a good CPP [9]. Moreover this peptide was reported to possess anti-tumor activity, namely, to decrease the mobility and proliferation of cancer cells (EF cells), this without being cytotoxic (up to 20  $\mu$ M; in both NIH 3T3 and EF cells) [10]. The mechanism of action of this peptide is not well understood. Lamaziere et al. have shown that RW16 induced GUVs (Giant Unilamellar Vesicles) adhesion and vesicle aggregation for certain lipid compositions. Aside from these liposome modifications

**Abbreviations:** AMP, Anti-microbial peptide; APA, Amino pentanoic acid; CD, Circular dichroism; CHO, Chinese hamster ovary; CPP, Cell-penetrating peptide; DLS, Dynamic Light Scattering; DMPC, Dimyristoyl phosphatidylcholine; DMPG, Dimyristoyl phosphatidylglycerol; DOPC, Dioleoyl phosphatidylcholine; DOPE, Dioleoyl phosphatidylethanolamine; DOPG, Dioleoyl phosphatidylglycerol; DOPS, Dioleoyl phosphatidylserine; DPPC, Dipalmitoyl phosphatidylcholine; DSC, Differential Scanning Calorimetry; GUV, Giant Unilamellar Vesicle; ITC, Isothermal Titration Calorimetry; LUV, Large unilamellar vesicle; MIC, Minimal inhibitory concentration; MLV, Multilamellar vesicle; PC, Phosphatidylcholine; PE, Phosphatidylethanolamine; PG, Phosphatidylglycerol; PS, Phosphatidylserine; SAR, Structure–activity relationship

\* Corresponding author. Tel.: +33 5 40 00 68 49.

E-mail address: [i.alves@cbmn.u-bordeaux.fr](mailto:i.alves@cbmn.u-bordeaux.fr) (I.D. Alves).



they have found that RW16 induced calcein leakage without being lethal to the cells [11]. It is interesting to notice that recent studies have shown that some CPPs preferentially accumulate in cancer cells [12–14]. This selectivity toward cancer vs healthy cells might be directly correlated with the richness in anionic components in their cell membranes. Indeed several studies indicated that cancer cell membranes overexpress certain proteoglycans such as glypicans and syndecans which are implicated in several aspects of tumorigenesis such as cell adhesion, growth and motility [15–18]. Additionally, when cells become apoptotic their trans-membrane asymmetry is strongly perturbed with an increase in the levels of phosphatidylserine (PS) in the outer membrane leaflet, of up to 9% [19]. These components in the cancer cell membranes render them additionally anionic relative to healthy cell membranes which can be favorable for the interaction with cationic molecules such as CPPs.

In the present study the structural characterization and interaction mechanism of RW16 with different membrane models (composed of zwitterionic and/or anionic lipids) was performed. The zwitterionic lipid system was employed as a mimic of the outer leaflet of a healthy eukaryotic cell and the anionic system to model the enhanced anionic character of apoptotic cells. The interaction, affinity, perturbation of the lipid model systems upon RW16 interaction as well as the structural changes occurring in the peptide upon this interaction was investigated. Studies were performed using several biophysical techniques and lipid model systems to mimic healthy and cancer cell membranes. CPPs and antimicrobial peptides share common features namely their cationic nature [20] and in the particular case of RW16 the amphipathicity. Additionally several cell penetrating peptides have been reported to possess antimicrobial activity, including penetratin and its analogues [21–25]. Therefore the antimicrobial activities of RW16 were investigated against *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Klebsiella pneumoniae*. Furthermore efficient antimicrobial peptides have also been shown to possess anticancer activity [26–28].

The analysis of the results obtained was complicated by the fact that RW16 alone autoassociates at increasing peptide concentrations, a property arising from its amphipathic character. Overall the studies indicate an enhanced interaction and perturbation of RW16 with anionic vs zwitterionic lipids which is specially marked when the peptide is in its oligomerized form. While this would indicate that electrostatic interactions are important in the P/L interaction, which is rather expected, the studies show that important hydrophobic interactions take place. Such interactions can be explained by a peptide flip, following the initial electrostatic contacts, probably around the Arg with the insertion of Trp residues in the fatty acid chain core. A model is proposed to explain the markedly distinct behavior of RW16 in interaction with anionic vs zwitterionic lipids that also takes into account the peptide oligomerization state. This preferential interaction and perturbation in membranes enriched in anionic components may explain the reported anti-tumor activity of this peptide and CPPs in general.

## 2. Materials & methods

### 2.1. Materials

All lipids were purchased from Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL). The calcein was obtained from Sigma. Biot(O<sub>2</sub>)-Apa-RW16-NH<sub>2</sub> (RRWRRWRRWRRWRR) synthesis and purification was performed using Boc solid phase strategy. The bacterial strains were kindly provided by the laboratory of Pierre Nicolas.

### 2.2. Antimicrobial activity

Gram-positive eubacteria (*S. aureus*) and Gram-negative eubacteria (*E. coli* 363 and *K. pneumoniae*) were cultured as described previously [29]. The minimal inhibitory concentrations (MICs) of peptides were determined in 96-well microtitration plates by growing the bacteria in the presence of 2-fold serial dilutions of peptide. Aliquots (10  $\mu$ L) of

each serial dilution were incubated for 16 h at 37 °C with 100  $\mu$ L of a suspension of a midlogarithmic phase culture of bacteria, at a starting absorbance A<sub>630</sub> = 0.01 in Poor-Broth nutrient medium (1% bactotryptone and 0.5% NaCl, w/v) (peptide final concentrations ranged from 0.1 to 100  $\mu$ M). Inhibition of growth was assayed by measuring the absorbance at 630 nm. The MIC was defined as the lowest concentration of peptide that inhibited the growth of about 99% of the cells. Bacteria that was incubated with the peptide corresponding to the MIC was plated out on solid culture medium containing 1% noble agar to distinguish between lytic and non-lytic effects. The peptide was considered to be lytic if after overnight incubation with the peptide (at the MIC concentration) the bacteria development was inhibited and non-lytic when the bacteria was able to re-grow upon peptide incubation. All assays were performed in triplicate plus positive controls without the peptide and negative controls with 0.7% formaldehyde.

### 2.3. Preparation of liposomes

All liposomes were prepared by initially dissolving the appropriate amount of phospholipids, to obtain the desired concentration, in chloroform and methanol (2/1 v/v) to ensure the complete mixing of the components. A lipid film was then formed by removing the solvent using a stream of N<sub>2</sub> (g) followed by 3 h vacuum. To form MLVs, the dried lipids were dispersed in buffer (either Tris 10 mM, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA pH 7.4 or phosphate 10 mM, NaCl 150 mM, EDTA 2 mM pH 7.4 buffer depending on the technique used) and thorough vortexed. To form LUVs, the MLV dispersion was run through five freeze/thawing cycles and passed through a mini-extruder equipped with two stacked 0.1  $\mu$ m polycarbonate filters (Avanti, Alabaster, AL).

### 2.4. Turbidity

Turbidity of LUVs was followed by measuring the absorbance at 436 nm upon addition of increasing peptide concentration (P/L ratios of 1/100, 1/50, 1/25, 1/10 were used). The measurements were acquired on a Jasco V-630 spectrometer at room temperature (~22 °C).

### 2.5. Dynamic Light Scattering (DLS)

DLS measurements were performed using an ALV laser goniometer, equipped with a 22 mW HeNe linearly polarized laser operating at 632.8 nm and an ALV-5000/EPP multiple  $\tau$  digital correlator with 125 ns initial sampling time. Measurements were performed at a scattering angle of 90° and the intensity correlation functions were analyzed using the software provided by the company, to give the hydrodynamic radius (Rh) of the scattering particles. All measurements were performed at room temperature in phosphate buffer. To get an insight into the influence of RW16 on LUVs integrity, 100  $\mu$ L of a 1 mg/mL LUV solution was analyzed by DLS, followed by addition of a small volume of RW16 (1 mM) to the LUV suspension to the desired P/L ratio (1/100, 1/50, 1/25, 1/10) and particle size again analyzed, immediately. The same measurements were performed in the absence of LUVs to determine whether the peptide auto-aggregates.

### 2.6. Tryptophan fluorescence

Small volumes of LUV suspensions (1 mM) were successively added to the peptide solution (0.5  $\mu$ M) to obtain different P/L ratios: 1/10, 1/25, 1/50 and 1/100. After 2 min incubation, fluorescence spectra were recorded using an excitation wavelength ( $\lambda_{exc}$ ) of 278 nm (5 nm bandwidth) and emission wavelength ( $\lambda_{em}$ ) in the interval from 300 nm to 500 nm (10 nm bandwidth). The scan speed was 200 nm/min and the spectra were averaged over 10 accumulations. Fluorescence measurements were made on a Perkin Elmer LS55 spectrometer (Buckinghamshire, UK). The blue shift was plotted against the lipid concentration and fitted using a hyperbolic function being

able to provide the concentration of lipids at which the half-shift of the Trp emission spectrum was observed.

## 2.7. Calcein leakage

Calcein-containing LUVs were made using the same protocol used to make regular LUVs, except for the hydration step made with Tris buffer of the lipid films, which contained 70 mM calcein [30]. Free calcein was separated from the calcein-containing LUVs using size exclusion column chromatography (Sephadex G-75) with Tris as elution buffer. The concentration of lipids was estimated using Rouser protocol [31]. For the assay, the lipid concentration was set at 1  $\mu$ M and peptide concentration was allowed to vary from 1 nM to 500 nM (P/L ratio of 1/1000 to 1/2 respectively). All measurements were performed with a Perkin Elmer LS55 spectrometer (Buckinghamshire, UK). Data were collected every 1 s at room temperature using a  $\lambda_{\text{exc}}$  at 485 nm and  $\lambda_{\text{em}}$  at 515 nm with an emission and excitation slit of 2.5 nm in a cuvette of 2 mL.

The fluorescence from calcein at 70 mM concentration was low due to self-quenching, but increased considerably upon dilution. The fluorescence intensity at the equilibrium was measured after 2.5 h. At the end of the assay, complete leakage of LUVs was achieved by adding 100  $\mu$ L of 10% Triton X-100 solution dissolving the lipid membrane without interfering with the fluorescence signal. The percentage of calcein release was calculated according to the following equation:

$$\% \text{Calcein leakage} = (\text{Ft} - \text{Fo}) / (\text{Ff} - \text{Fo}) * 100 \quad (1)$$

where the percent of calcein leakage is the fraction of dye released (normalized membrane leakage), Ft is the measured fluorescence intensity at time t, and Fo and Ff are respectively the fluorescence intensities at times t = 0, and after final addition of Triton X-100, respectively. A dilution correction was applied on the fluorescence intensity after injection of the Triton X-100. Each experiment was repeated three times.

## 2.8. $^{31}\text{P}$ Nuclear Magnetic Resonance ( $^{31}\text{P}$ NMR)

MLVs were prepared as described in Section 2.3 at a concentration of 150 mg/mL in  $\text{D}_2\text{O}/\text{H}_2\text{O}$  (90:10) and NMR acquisition was performed in a rotor of 100  $\mu$ L. The peptide was added as a powder to the liposomes to obtain a P/L ratio of 1/100 and then thoroughly vortexed to ensure sample equilibrium. NMR experiments were carried out on a Bruker Advance DPX 400 NB spectrometer by the mean of a QNP-Probe ( $^1\text{H}/^{31}\text{P}$ - $^{13}\text{C}$ - $^{19}\text{F}$ ).  $^{31}\text{P}$  NMR spectra were acquired at 161.97 MHz, using a phase-cycled Hahn-echo pulse sequence with gated broadband proton decoupling. Typical acquisition parameters were as follows: spectral window of 50 kHz,  $\pi/2$  pulse widths of 14  $\mu$ s, interpulse delays of 50  $\mu$ s, a recycle delay of 5 s, 128 scans were recorded and a scanning of temperature from 2 to 20  $^\circ\text{C}$  was applied. A line broadening of 50 Hz and baseline correction was usually applied prior to Fourier transformation. The amount of each phase (lamellar, hexagonal and isotropic phases) was determined by simulation of the experimental spectrum [32] (T. Pott and E.J. Dufourc, unpublished data).

## 2.9. Circular dichroism (CD)

CD data was recorded on a Jasco J-815 CD spectrophotometer with a 1 mm path length. Far-UV spectra were recorded from 180 to 270 nm with a 0.5 nm step resolution and a 2 nm bandwidth at 37  $^\circ\text{C}$ . The scan speed was 50 nm/min (0.5 s response time), and the spectra were averaged over 8 scans. CD spectra were collected for samples of RW16 in phosphate buffer with and without liposomes at different P/L ratios (1/100, 1/50, 1/25, 1/10). For each sample, the background (buffer) was automatically subtracted from the signal. Spectra were smoothed using a Savitzky–Golay smoothing filter. Spectra were deconvoluted

using the software CD Friend previously developed in our laboratory (S. Buchoux, unpublished).

## 2.10. Plasmon Waveguide Resonance (PWR)

PWR spectra are produced by resonance excitation of conduction electron oscillations (plasmons) by light from a polarized CW laser (He–Ne; wavelength of 632.8 and 543.5 nm) incident on the back surface of a thin metal film (Ag), deposited on a glass prism and coated with a layer of  $\text{SiO}_2$ . Experiments were performed on a beta PWR instrument from Proterion Corp. (Piscataway, NJ) that had a spectral angular resolution of 1 mdeg. PWR spectra, corresponding to plots of reflected light intensity versus incident angle, can be excited with light whose electric vector is either parallel (s-polarization) or perpendicular (p-polarization) to the plane of the resonator surface.

The sample to be analyzed (a lipid bilayer membrane) was immobilized on the resonator surface and placed in contact with an aqueous medium, into which drugs can be introduced. The self-assembled lipid bilayers were formed using a solution (in butanol/squalene 95/5 v/v) of 10 mg/mL of lipids. The method used to make the lipid bilayers is based on the procedure by Mueller and Rudin to make black lipid membranes across a small hole in a Teflon block [33]. To accomplish this, a small amount ( $\sim 2.5$   $\mu$ L) of lipid solution was injected into the orifice in a Teflon block separating the silica surface of the PWR resonator from the aqueous phase. Spontaneous bilayer formation was initiated when the sample compartment was filled with aqueous buffer solution. The molecules (such as lipids and drugs) deposited onto the surface plasmon resonator change the resonance characteristics of the plasmon formation and can thereby be detected and characterized (for more details see [34]). The peptide was injected into the cell sample compartment containing the lipid membrane in an incremental fashion. The amount of lipid bound drug is associated with the resonance shift observed by PWR, the total amount being the amount of drug added to the chamber. Since the PWR is only sensitive to the optical properties of material that is deposited on the resonator surface, there is no interference from the material that is in the bulk solution. Moreover, the amount of bound material is much smaller than the total amount of peptide present in the bulk solution, and it is assumed that the bulk material is able to freely diffuse and equilibrate with the membrane. Data were fitted (GraphPad Prism) through the following hyperbolic function that describes the binding of a ligand to a receptor, providing the dissociation constants:  $Y = (B_{\text{max}} X) / (K_d + X)$ .  $B_{\text{max}}$  represents the maximum concentration bound, and  $K_d$  is the concentration of ligand required to reach half-maximal binding [35]. It should be noted that since concomitantly with the binding process other processes, such as membrane reorganization and solvation occur, the dissociation constants correspond to apparent dissociation constants. Graphical analysis allows one to obtain information about changes in the mass density, structural asymmetry, and molecular orientation induced by bimolecular interactions occurring at the resonator surface. By plotting the spectral changes observed in a (s, p) coordinate system where mass ( $\Delta_m$ ) and anisotropy ( $\Delta_{\text{str}}$ ) axes are represented based on the PWR sensitivity factor, the contribution of mass and structural changes can be obtained [36,37]. Each point in the mass and anisotropy axis can be expressed by changes in the original coordinates ( $\Delta p$  and  $\Delta s$ ) by the following equations:

$$\Delta_m = [(\Delta s)_m^2 + (\Delta p)_m^2]^{1/2} \quad (2)$$

$$\Delta_{\text{str}} = [(\Delta s)_{\text{str}}^2 + (\Delta p)_{\text{str}}^2]^{1/2} \quad (3)$$

The sensitivity factor (Sf), a measure of the sensitivity of the instrument for the s-polarization relative to p-polarization ( $Sf = \Delta s / \Delta p$ ), necessary to determine the mass and anisotropy axes has been determined, for the prism used in those experiments, to be 0.74 [38].

### 2.11. Differential Scanning Calorimetry (DSC)

Microcalorimetry experiments were performed with a Nano DSC-II microcalorimeter (CSC) driven by a DSC-run software. The peptide was gradually added to the same sample of lipid MLVs to obtain peptide/lipid molar ratios of 1/100, 1/50 and 1/25. The lipid concentration was 1 mg/mL (ca. 1.45 mM), except for: DMPG/DPPC where the concentration was 4 mg/mL (ca. 5.66 mM), DMPC/Chol and DMPG/Chol where the concentration was 6 mg/mL (ca. 8.9 and 9.05 mM respectively). For each peptide concentration, a minimum of four heating and four cooling scans were performed so that equilibrium is reached. A scan rate of 1 °C/min was used and there was a delay of 10 min between sequential scans in a series to allow thermal equilibration. Data analysis was performed by the fitting program CPCALC provided by CSC and using the Software Origin for the deconvolution.

### 2.12. Isothermal Titration Calorimetry (ITC)

ITC experiments were performed on a Microcal ITC200 at different temperatures between 15 and 40 °C. To avoid air bubbles, peptide and LUV solutions were degassed under vacuum before use. Titrations were performed by injecting 2.5 µL aliquots of LUVs (lipid concentration 12.6 mM in a syringe of 40 µL) into the calorimeter cell of 200 µL containing the peptide solution (peptide concentration 0.1 mM), with 10 min waiting between injections. A blank was performed where the LUVs were titrated into the same buffer used for the above experiments (Tris buffer). Data analysis was performed using the program Origin 7.0 microCal. All curves were fit using a nonlinear least-squares “One Set of Sites” (1:1 interactions) model.

### 2.13. Cryo-Transmission Electronic Microscopy (Cryo-TEM)

RW16 was mixed with DOPC or DOPG LUVs (1 mM) in Tris buffer for a final peptide concentration of 40 µM (P/L ratio of 1/25). After 1 h incubation, a 5 µL sample was deposited onto a lacey carbon copper grid (Ted pella) placed in the automated device for plunge-freezing (EM GP Leica) enabling a perfect control of temperature (15 °C) and relative humidity (70%). The excess of sample was blotted with filter paper and the grid was plunged into a liquid ethane bath cooled and maintained at −183 °C with liquid nitrogen. Specimens were maintained at a temperature of approximately −170 °C, using a cryo holder (Gatan, CA, USA) and observed with a FEI Tecnai F20 electron microscope operating at 200 kV and at nominal magnifications of 19,000× or 50,000× under low-dose conditions. Images were recorded with a 2k×2k USC 1000 slow-scan CCD camera (Gatan) and analyzed using ImageJ.

## 3. Results and discussion

The choice in terms of the model membrane lipid composition used in each experiment has taken into account several aspects among which the typical composition of the cell membrane to mimic and the limitations of the technique employed. Eukaryotic cell membranes contain essentially zwitterionic lipids such as phosphatidylcholine lipids (PC) so this kind of lipid was used to mimic those cells. Several studies have shown that the cell membrane composition changes in cancer cells with overexpression of certain types of proteoglycans and the enrichment in the outer leaflet of negatively charged lipids (such as phosphatidylserine, PS) [15,16,18,19]. Therefore, overall cancer cells possess a more negatively charged membrane than normal cells. In view of the potential of RW16 in decreasing the motility (migration speed, random motility coefficient, wound healing) of the tumor cells and its intracellular actin-remodeling activity [10], the study of the interaction of this peptide with membranes mimicking cancer cells is of interest. To mimic the cancer cell membrane negatively charged lipids such as phosphatidylglycerol (PG) and PS were used in the present

studies. Additionally bacterial membranes are rich in negatively charged lipids such as PG and as will be presented below RW16 as antimicrobial activity. Depending on the limitations of each technique, the fatty acid chain length and degree of unsaturation was chosen accordingly.

### 3.1. Antimicrobial activity

The antibacterial activity of RW16 was assayed against Gram-negative and Gram-positive bacteria (Table 1). RW16 inhibited the growth of both Gram-positive and Gram-negative bacteria with minimal inhibitory concentrations in the low micromolar range. It is interesting to note that for peptide concentrations around the MIC value in the case of *S. aureus*, the bacteria appeared non-homogeneously dispersed in the plate being agglomerated in certain regions. This was not observed for the other two bacterial strains investigated. For *E. coli* and *S. aureus*, the lytic activity of RW16 was tested by incubating bacteria overnight with a RW16 concentration corresponding to the MIC. No colony-forming units appeared in the case of *E. coli*, indicating that RW16 is bactericidal. In the case of *S. aureus*, the bacteria were able to re-grow after being incubated with RW16 at the MIC concentration, demonstrating the bacteriostatic activity of RW16 on this bacterial strain.

### 3.2. Peptide effect on turbidity and homogeneity of membrane models

Turbidity experiments (Fig. 1) followed absorbance changes at 436 nm of vesicle suspensions of DOPC, DOPE, DOPG and DOPS LUVs upon gradual addition of RW16. We have observed that addition of peptide to zwitterionic (DOPC or DOPE) LUVs caused no changes in turbidity, whereas they lead to a massive increase in the turbidity of DOPG or DOPS LUVs indicating that vesicle aggregation occurred. This result shows that electrostatic interactions between negative charges of anionic membranes and the positive charges of RW16 (10 positive charges at pH 7) are inducing liposome aggregation. These results are not surprising since it has already been shown that cationic CPPs interact preferentially with negatively charged membrane [21,39–42]. When kinetic experiments were performed after the initial aggregation, a slow decrease in turbidity was observed after 3 min incubation (data not shown). This goes along the lines of a dissociation of the liposome aggregates with time, after the initial aggregation, rather than their fusion.

We also monitored the size of liposomes, following addition of peptide, by DLS to further understand the observed changes in LUVs turbidity (Table 2). We performed DLS experiments on RW16 alone to investigate whether the peptide auto-associates or not. In this case we have observed that below a concentration of 5 nM the size of the scattering particles was too small to be detectable but above this concentration the size rapidly increases to form objects with a size between 90 and 170 nm (data not shown). This indicates that RW16 rapidly forms oligomers at very low concentrations (concentrations comprised between 1 nM and 5 nM) probably due to high hydrophobic interactions between the Trp. RW16 being an amphipathic peptide, its autoassociation is expected and indeed was shown here to occur below a concentration of 5 nM. The experimental setup being different for each method used, the peptide was in the monomer form in some studies (PWR, calcein leakage) while in others was in oligomeric form (ITC, DSC, NMR, CD, Trp fluorescence). This aspect is important when analyzing the results as the nature

**Table 1**

Antimicrobial and lytic activities of RW16.<sup>a</sup> Results are the mean of three independent experiments each performed in duplicate.

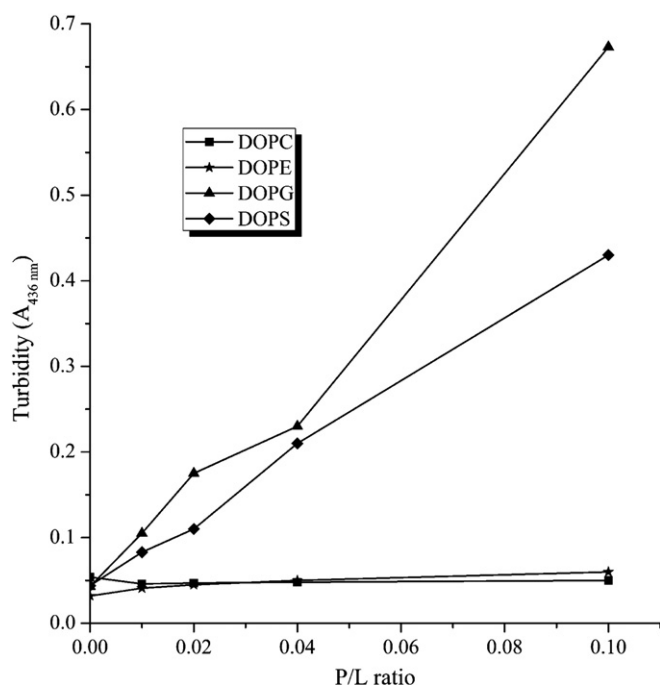
Peptide	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>K. pneumoniae</i>
RW16	10 µM <sup>b</sup>	5 µM <sup>c</sup>	> 100 µM

<sup>a</sup> The antimicrobial activity is expressed as MIC (µM), the minimal peptide concentration required for total inhibition of cell growth in liquid medium.

<sup>b</sup> Lytic effect observed at this concentration.

<sup>c</sup> No lytic effect observed at this concentration.





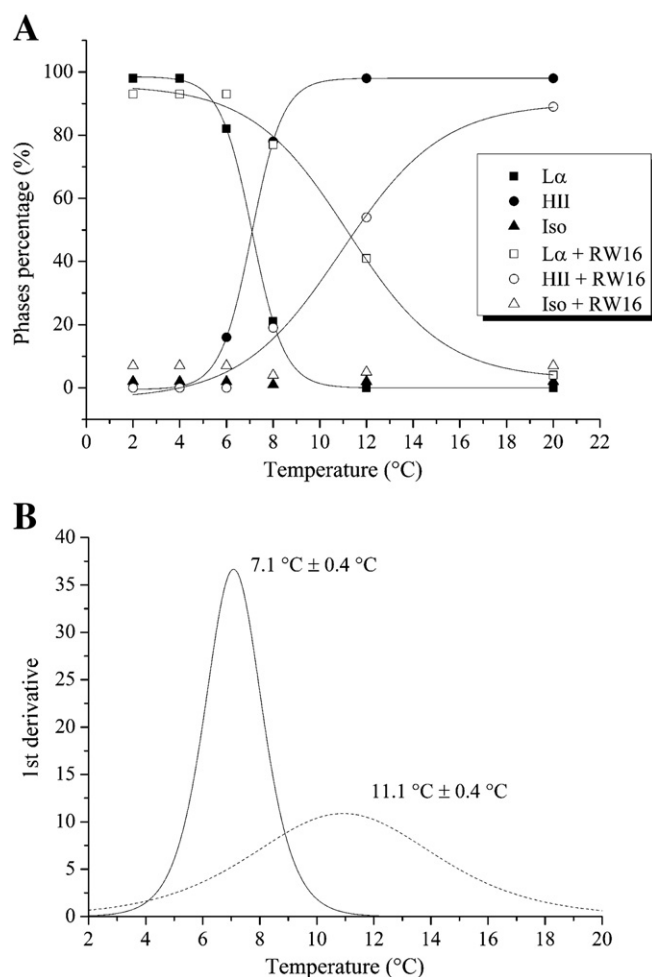
**Fig. 1.** Turbidity measurements of LUVs composed of DOPC, DOPE, DOPG and DOPS (all at 1 mg/mL in Tris buffer) following RW16 incremental addition (P/L ratios of 1/100, 1/50, 1/25 and 1/10 corresponding to 12.5  $\mu\text{M}$ , 25  $\mu\text{M}$ , 50  $\mu\text{M}$  and 125  $\mu\text{M}$  respectively). The experiments were performed in duplicate.

of the peptide exposed areas changes upon its oligomerization state. The monomeric form of the peptide has both hydrophobic and hydrophilic surfaces exposed. Peptide autoassociation should occur through the hydrophobic face, so the oligomer will have a hydrophobic core (mostly not accessible) and a hydrophilic available surface. In fact, fluorescence experiments were performed to compare the  $\lambda_{\text{max}}$  of RW16 with that of penetratin, a peptide that has not been shown to oligomerize. The  $\lambda_{\text{max}}$  of the Trp fluorescence of RW16 alone was slightly shifted (347 nm) compared to that of the penetratin alone (350 nm, data not shown).

DLS experiments on liposomes show that DOPC vesicle size did not change upon peptide addition. In the case of DOPE LUVs the polydispersity index was too high to be able to exploit the data but it seems that larger or different objects were formed. This could be due to the propensity of PE to form inverted micelles as it has been observed by Seddon [43]. In the case of DOPS and DOPG LUVs, a significant increase of the liposome size that could reach about 1  $\mu\text{m}$  of hydrodynamic radius was observed. Measurements were taken immediately after peptide addition to liposomes and an increase in the solution turbidity was seen right away. After several days, a lipid deposit at the bottom of the tubes was formed. Thereby, one can assume that electrostatic interactions between the peptide and the lipid play an important role in liposome behavior in terms of homogeneity and aggregation. Similar behavior was observed in the case of RL16, a peptide with the same

sequence but with Leu residues instead of Trp [21]. Other CPPs such as penetratin, and arginine-rich peptides as well as antimicrobial peptides which also possess a great amount of positively charged residues also show important electrostatic interactions with anionic lipids [21,39–42,44]. From the data we cannot yet predict whether the larger objects observed arise from liposome aggregation or fusion.

To better understand the peculiar behavior of PE liposomes in the presence of the peptide (no changes in turbidity but increase in particle sizes), we have performed  $^{31}\text{P}$  NMR on DOPE MLVs in the absence or presence of RW16 (Figs. 2 and S2). The peptide was added to the liposomes at a P/L ratio of 1/100 and temperature was scanned from 2 to 20  $^{\circ}\text{C}$ . We have observed that the transition from the lamellar phase ( $\text{L}\alpha$ ) to the hexagonal type II phase ( $\text{H}_{\text{II}}$ ) occurred at  $7.1\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0.4\text{ }^{\circ}\text{C}$  and in the presence of RW16 at  $11.1\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0.4\text{ }^{\circ}\text{C}$ . This result shows that the peptide stabilizes the lamellar phase, which could be explained by an intercalation of the peptide between the lipid polar headgroups without insertion into the bilayer core. This location would counteract the natural effect of PE lipids to induce a local negative curvature prompting for hexagonal type II phases. It also appears that the peptide promotes a small percentage of isotropic phases (sharp peak centered at 0 ppm). This would suggest that the RW16 peptide promotes in addition a limited, but detectable, membrane restructuring with appearance of  $\mu\text{m}$ -sized MLVs. To conclude RW16 interacts, in a moderate way, with PE lipids.



**Fig. 2.** (A) Percentages of lamellar ( $\text{L}\alpha$ ), hexagonal type II ( $\text{H}_{\text{II}}$ ) and isotropic (Iso) phases of DOPE as a function of the temperature in the absence (filled symbols) and presence (empty symbols) of 1/100 of RW16 (2 mM). The points were fitted through a sigmoidal curve. (B) First derivative of the percentages of lipid phases represented in A in the absence (solid line) and presence (dashed line) of RW16 at P/L 1/100.

**Table 2**

Vesicle size distribution from Dynamic Light Scattering measurements of LUVs composed of DOPC, DOPE, DOPS and DOPG expressed as the hydrodynamic diameter (nm). The lipid concentration was 1 mg/mL to which peptide was gradually added. The experiments have been done in duplicate at room temperature.

P/L ratio	DOPC	DOPE	DOPS	DOPG
0	120 $\pm$ 10	145 $\pm$ 15	115 $\pm$ 5	120 $\pm$ 10
1/100	122 $\pm$ 12	267 $\pm$ 107 <sup>a</sup>	121 $\pm$ 11	133 $\pm$ 19
1/50	116 $\pm$ 6	472 $\pm$ 252 <sup>a</sup>	140 $\pm$ 30	261 $\pm$ 100 <sup>a</sup>
1/25	121 $\pm$ 11	757 $\pm$ 7	141 $\pm$ 31	302 $\pm$ 64 <sup>a</sup>
1/10	125 $\pm$ 15	759 $\pm$ 440 <sup>a</sup>	1235 $\pm$ 565 <sup>a</sup>	1244 $\pm$ 284 <sup>a</sup>

<sup>a</sup> The error bars were too important to establish an exact size of the liposomes.

### 3.3. Peptide effect on lipid organization and membrane integrity

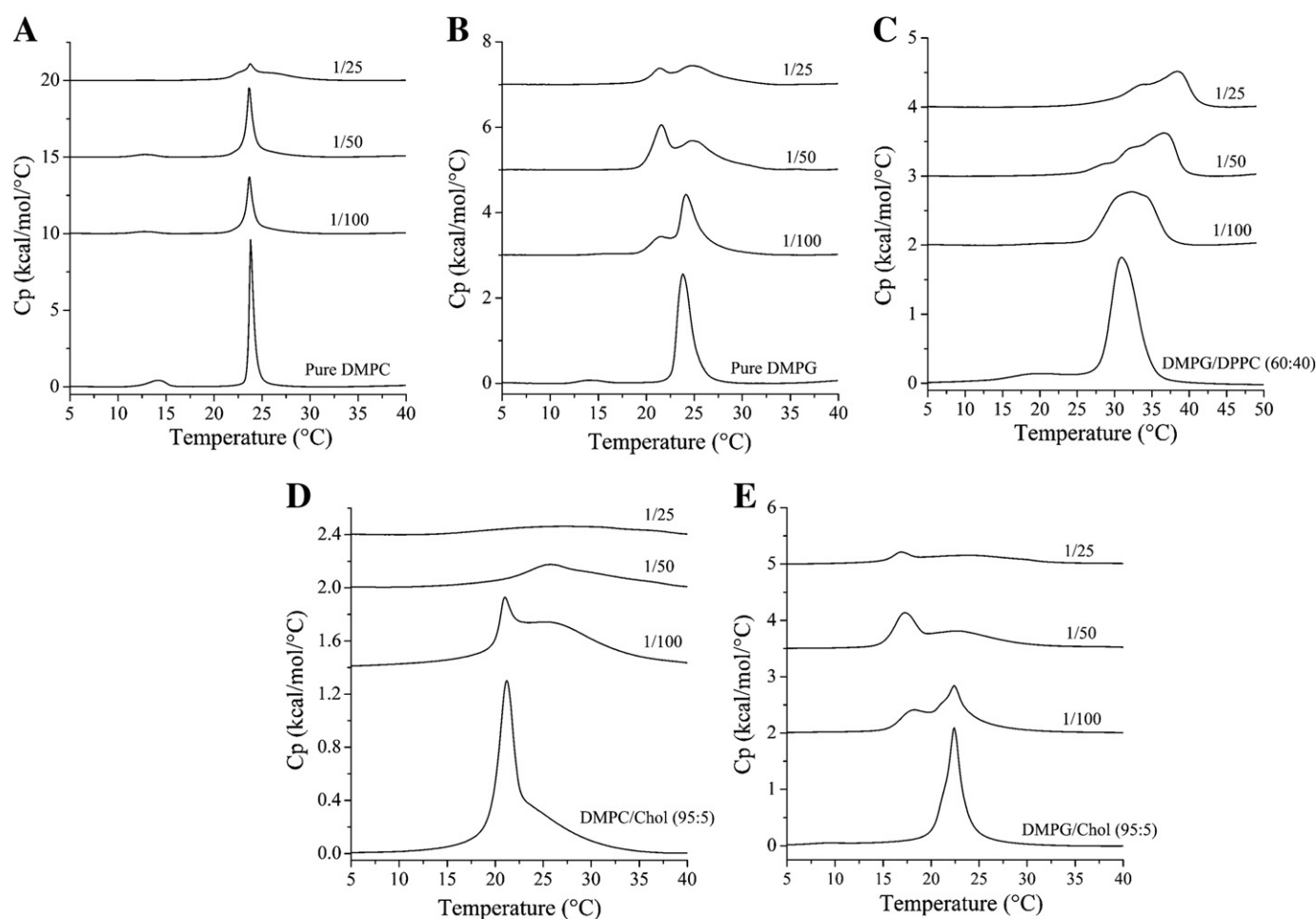
The interaction of RW16 with phospholipids was studied by monitoring the way this peptide affects the  $L\beta$  gel phase to the  $P\beta'$  ripple phase (pre-transition temperature,  $T_{pre}$ ) and the  $P\beta'$  ripple phase to the  $L\alpha$  liquid phase (main transition temperature,  $T_m$ ) transitions of different lipids. Indeed, the phase transition temperature and thermodynamics of lipid phase transitions are extremely sensitive to the presence of exogenously added compounds. Herein, we have chosen to use C14 fatty acyl chain lipids as their phase transition is close to room temperature, which facilitates handling (reason why they are often used in DSC studies, despite their absence in cell membranes). The experiments were performed with MLVs rather than other type of vesicles because MLVs give a higher magnitude and more homogeneous signal in DSC [45]. DSC heating endotherms illustrating the effect of RW16 on MLVs of DMPC, DMPC/Chol (95:5), DMPG, DMPG/Chol (95:5), DMPG/DPPC (60:40) are presented in Fig. 3 and the thermodynamic parameters obtained from these experiments are presented in Table 3.

Vesicles of DMPC exhibit two endothermic events, a less energetic pre-transition near 14 °C that arises from the conversion of the  $L\beta$  to the  $P\beta'$  phase and a more energetic main transition from the conversion of  $P\beta'$  to  $L\alpha$  phase around 24 °C. In interaction with DMPC (Fig. 3A, Table 3) the peptide decreases the pre-transition enthalpy ( $\Delta H_{pre}$ ) starting from very low concentrations ( $P/L = 1/100$ ). This decrease in the pre-transition enthalpy arises from a modification in the tilting of the lipid polar headgroups and shows an interaction between the peptide and the lipid polar headgroups. As for the main transition, RW16

does not significantly change the  $T_m$  but reduces the main transition enthalpy ( $\Delta H_m$ ) and increases the  $\Delta T_{1/2}$ . A change in  $\Delta H_m$  is the consequence of the disruption of van der Waals interactions between the hydrocarbon chains. It shows that the peptide is able to intercalate between the fatty acid chains reducing the cooperativity of the transition (reflected in the increase of the  $\Delta T_{1/2}$ ).

In terms of the pre-transition, RW16 affects strongly that of DMPG than DMPC, as it completely abolishes it, starting at very low concentrations ( $P/L = 1/100$ ) (Fig. 3B, Table 3). This may be a consequence of the more favorable electrostatic interaction between the negatively charged lipid headgroup and the positive charges in the peptide. At increasing concentrations of peptide we have observed a splitting of the main transition peak which has been suggested in the literature to arise from the coexistence of peptide-rich and peptide-poor domains in the bilayer [46,47]. We have observed an increase of the  $\Delta T_{1/2}$  which arises from a decrease of the cooperativity of the hydrocarbon chains due to the insertion of the peptide in the lipids.

While the role of electrostatics could be studied by just comparing the effect of the peptide on zwitterionic vs anionic lipid membranes (using single lipid liposomes), binary lipid mixtures containing lipids with sufficiently different phase transition temperatures have been used to evaluate the possible lipid recruitment induced by the peptide [48–50]. Herein we have worked with vesicles composed of DMPG/DPPC (60:40). We have to remind that the  $T_m$  of DMPG and DPPC are 24 °C and 41 °C, respectively. As presented in Fig. 3C the binary mixture presents a  $T_{pre}$  around 19.1 °C and a  $T_m$  around 30.9 °C. In interaction with these vesicles the peptide induces a splitting of the



**Fig. 3.** DSC thermograms illustrating the effect of the addition of increasing concentrations of peptide to DMPC (A), DMPG (B), DMPG/DPPC (60:40) (C), DMPC/Chol (95:5) (D) and DMPG/Chol (95:5) (E) vesicles.

**Table 3**

Thermodynamic parameters obtained with DSC experiments. For all experiments at least 4 scans were done in order to attain thermodynamic equilibrium. Two values indicate a splitting of the signal.

		Pre-transition				Main transition			
		T <sub>pre</sub> (°C)	ΔH (kcal/mol)	ΔS (cal/K/mol)	ΔT <sub>1/2</sub> (°C)	T <sub>m</sub> (°C)	ΔH (kcal/mol)	ΔS (cal/K/mol)	ΔT <sub>1/2</sub> (°C)
DMPC	Lipid	14.2	1.4	3	2	23.8	8.7	29	0.5
	1/100 RW16	12.7	0.6	2	2.6	23.7	6.2	21	0.8
	1/50 RW16	12.8	0.5	2	2.5	23.7	5.4	24	0.8
	1/25 RW16	12.9	0.1	0	3	23.7/26.5	2.9/2.5	9.8/8.3	2.2/4.2
DMPG	Lipid	14.3	0.3	1	3	23.8	6	20	1.5
	1/100 RW16	–	–	–	–	21.5/24.1	0.6/4.8	2/16	1.4/2.3
	1/50 RW16	–	–	–	–	21.6/24.8	2.2/4.4	7.5/15	1.5/4.2
	1/25 RW16	–	–	–	–	21.4/25	1.3/3.7	4.4/12	1.5/5.2
DMPG/DPPC (60:40)	Lipid	19.1	0.4	1	5.5	30.9	9	30	3.8
	1/100 RW16	–	–	–	–	32.2	6.5	21	6.9
	1/50 RW16	–	–	–	–	32.9/36.4	4.4/2.3	14/11	6.7/2.8
	1/25 RW16	–	–	–	–	34/38.4	2.82/2.13	9.2/6.8	5.94/2.97
DMPC/Chol (95:5)	Lipid	–	–	–	–	21.2/24.9	3.4/2.7	12/9.1	1.8/7.1
	1/100 RW16	–	–	–	–	21.1/25.8	0.7/6.2	2.4/21	1.4/10.9
	1/50 RW16	–	–	–	–	25.6/31.6	1.8/0.6	6/2	7.3/7.1
	1/25 RW16	–	–	–	–	27.3	3.5	12	22.9
DMPG/Chol (95:5)	Lipid	13.6	nd	nd	nd	22.4	5.8	20	1.9
	1/100 RW16	–	–	–	–	22.4/18	3.9/1.3	13/4.4	3.4/2.6
	1/50 RW16	–	–	–	–	23.2/17.3	4.1/2	14/6.9	8.6/2.2
	1/25 RW16	–	–	–	–	23.8/16.9	3.4/0.5	11/1.7	12.5/1.9

– The transition was not observed.

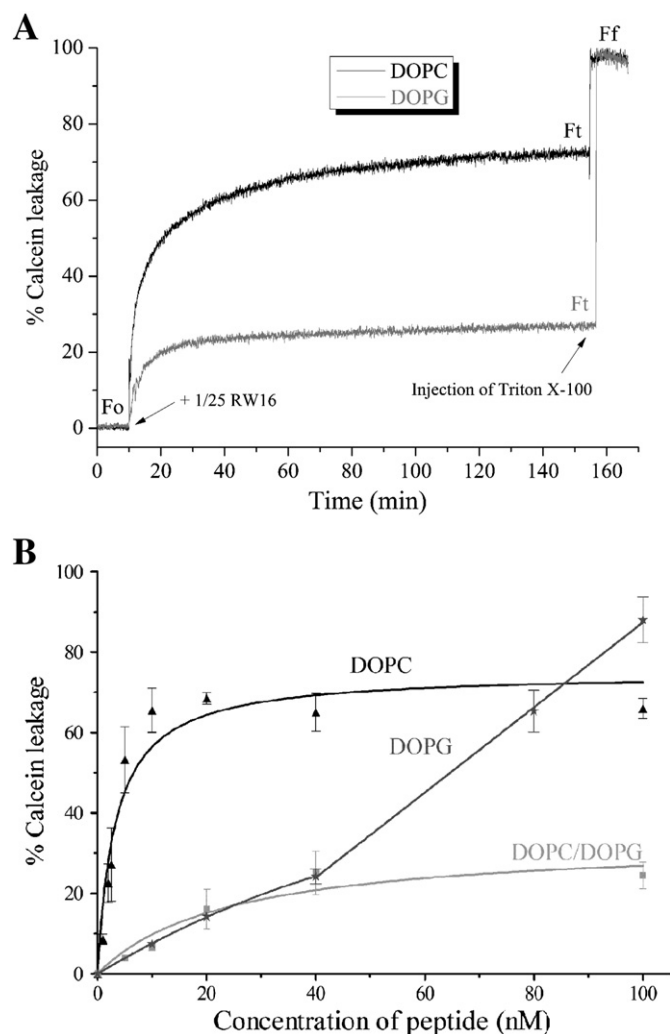
main transition peak at a P/L ratio 1/50. One peak is displaced to higher temperatures when increasing concentrations of peptides are added approaching the main transition of the DPPC (41 °C). This means that the peptide leads to the segregation of DPPC from the lipid mixture. Consequently the other peak, observed at a lower temperature, corresponds to the peptide-perturbed phase transition of DMPG. Since the T<sub>m</sub> of the DMPG-rich component is further away from the T<sub>m</sub> of DMPG pure (about 10 °C difference for P/L 1/25) than that of the DPPC-rich component from DPPC pure (less than 2 °C of difference for P/L 1/25), the DMPG-rich component is more affected, so more enriched in peptide. One should note that each lipid-rich component is not expected to possess a T<sub>m</sub> exactly similar to the T<sub>m</sub> of its main lipid component (even if no peptide is affecting its transition), this is because each component is not purely composed of its main lipid as there is always some of the other lipid component mixed. The data points to a preferential interaction of RW16 with a domain rich in DMPG and a segregation of a DPPC rich component. The driving force behind this peptide preference for DMPG might be either electrostatic and/or the greater fluidity of this lipid as we have observed in previous studies, where the preferential peptide interaction occurred with the lipids possessing lower T<sub>m</sub> [51]. Studies by other laboratories using DSC have also shown a preferential interaction of a peptide with one lipid component in a binary mixture and the consequent segregation of the other component [48–50].

When cholesterol is present in the DMPC vesicles (5%) the pre-transition is not observable (Fig. 3D, Table 3). Indeed cholesterol, by fluidifying the membrane, highly decreases the enthalpy of the phase transition abolishing the pre-transition signal and highly broadening the main transition. The main transition peak (around 21.2 °C) is splitted when the peptide is added, the enthalpy highly decreases and the ΔT<sub>1/2</sub> highly increases. In the presence of cholesterol (DMPC/Chol 95/5% mol/mol) the decrease in enthalpy is considerably more important than in the case of DMPC vesicles (we have observed a decrease in enthalpy of 80% with DMPC/Chol and 46% with DMPC alone). The higher decrease in the cooperativity of the main transition observed in the presence of cholesterol shows that the peptide affects more the fatty acid chain packing in the presence of cholesterol. This suggests that cholesterol, by inducing the formation of a liquid ordered phase (Lo) in the membrane, improves peptide insertion into the bilayer. In the case of DMPG/Chol (95/5% mol/mol) vesicles, the behavior of the lipids with increasing concentrations of peptide is practically the same as that

observed for DMPG alone (both in terms of enthalpy and cooperativity of the transition) (Fig. 3E). The fact that the presence of cholesterol does not change the mode of interaction of RW16 with anionic lipids suggests that the peptide penetrates less deep in the fatty acid chain region in the presence of anionic lipids vs zwitterionic ones.

The membrane perturbation effect of the peptide was then investigated by calcein leakage experiments. LUVs composed of DOPC, DOPG and DOPC/DOPG (8:2) were used and P/L ratios in the range of 1/1000 to 1/10. Smaller P/L ratios were used here (P/L 1/1000) compared to other experiments (usually the smallest P/L ratio was 1/100) because calcein leakage started to occur at very low concentrations. Contrarily to previous experiments, here lipids with C18:1 fatty acid chains were used to ensure that lipids were in the fluid phase at room temperature (the T<sub>m</sub> of these lipids is inferior to 0 °C). For this kind of experiments if lipids are in the gel phase the calcein leaks automatically due to the rigidity and defects of the bilayer. In the absence of RW16 a low fluorescence signal was observed due to calcein self-quenching inside the liposomes, no leakage from liposomes occurred under these conditions (Fig. 4A). Kinetic experiments show that RW16 leads to a very fast leakage that occurs in a matter of seconds and that saturates in about 2 h (P/L ratio 1/25, Fig. 4A, Ft). When the peptide was incrementally added to DOPC LUVs a strong increase in the percentage of calcein leakage was observed starting from very low P/L ratio (1/1000). Additionally, the signal saturated at very low peptide concentration (~20 nM, P/L ratio 1/50) (Fig. 4B). When monitoring the changes in calcein leakage using different peptide concentrations, one can see that leakage started to occur at very low concentrations of RW16 (1 nM) and that it rapidly reached saturation (with a leakage of ~75%) for a concentration of peptide of 40 nM (which corresponds to P/L = 1/25). The plot was fitted through a hyperbolic curve allowing determination of a half maximum activity of 3.2 ± 0.7 nM. The leakage process seems to be cooperative, as it has already been observed by other laboratories. Indeed it has been shown that cooperative insertion of the peptide could occur. This peptide insertion (only few peptide molecules are sufficient) would create a mass imbalance and membrane destabilization [52]. This mass imbalance has also been demonstrated using molecular dynamics simulations as a mechanism responsible for strong membrane perturbation leading to formation of membrane defects [53–55].

The calcein leakage behavior of DOPG liposomes is more complicated to analyze. While at low concentrations (up to 40 nM that corresponds to a P/L of 1/25) there is less leakage than with DOPC and



**Fig. 4.** (A) Typical fluorescence measurements for a calcein leakage experiment. The peptide is added (in this case with a P/L ratio of 1/25) to LUVs after ~10 min to check any basal leakage ( $F_o$ ) and Triton X100 is added at the end of the measurement ( $F_f$ ), that is after ~2.5 h to obtain the maximum liposome leakage ( $F_t$ ). (B) Calcein leakage from DOPC (black), DOPG (dark gray) and DOPC/DOPG (80:20) LUVs (gray) upon peptide addition in the range 0–100 nM. All data were fitted using a hyperbolic curve, except in the case of DOPG where a two phases fit (hyperbolic and linear) was performed. Error bars mean SEM on at least 3 experiments.

the response is hyperbolic although much less cooperative, at high concentrations (above P/L 1/25) the response is linear and strong leakage is observed. This data has to be taken with caution as it has been observed by DLS and turbidity that strong perturbations in anionic liposomes size occur at high P/L ratios with aggregation of objects. When the vesicles were composed of DOPC/DOPG (8:2) the profile of the curve is very similar to that of DOPG at low peptide concentrations indicating that the peptide is first interacting with anionic lipids in a cooperativity manner. Once all the anionic lipids are occupied, the peptide interacts with zwitterionic lipids always in a cooperativity manner as observed in the case of DOPC alone. The percentage of leakage is similar to that of DOPG at low concentrations. This interpretation agrees well with that proposed in the DSC experiments on DMPC/PPC LUVs (Fig. 3C, Table 3) and reinforces the anionic lipid segregation theory. Furthermore it could suggest that the higher the complexity of lipid model composition, the less they are susceptible to perturbation compared to model membranes composed of single lipids. Although these effects may partly be due to specific interactions between the peptides and the phospholipid headgroups, they also suggest a competition

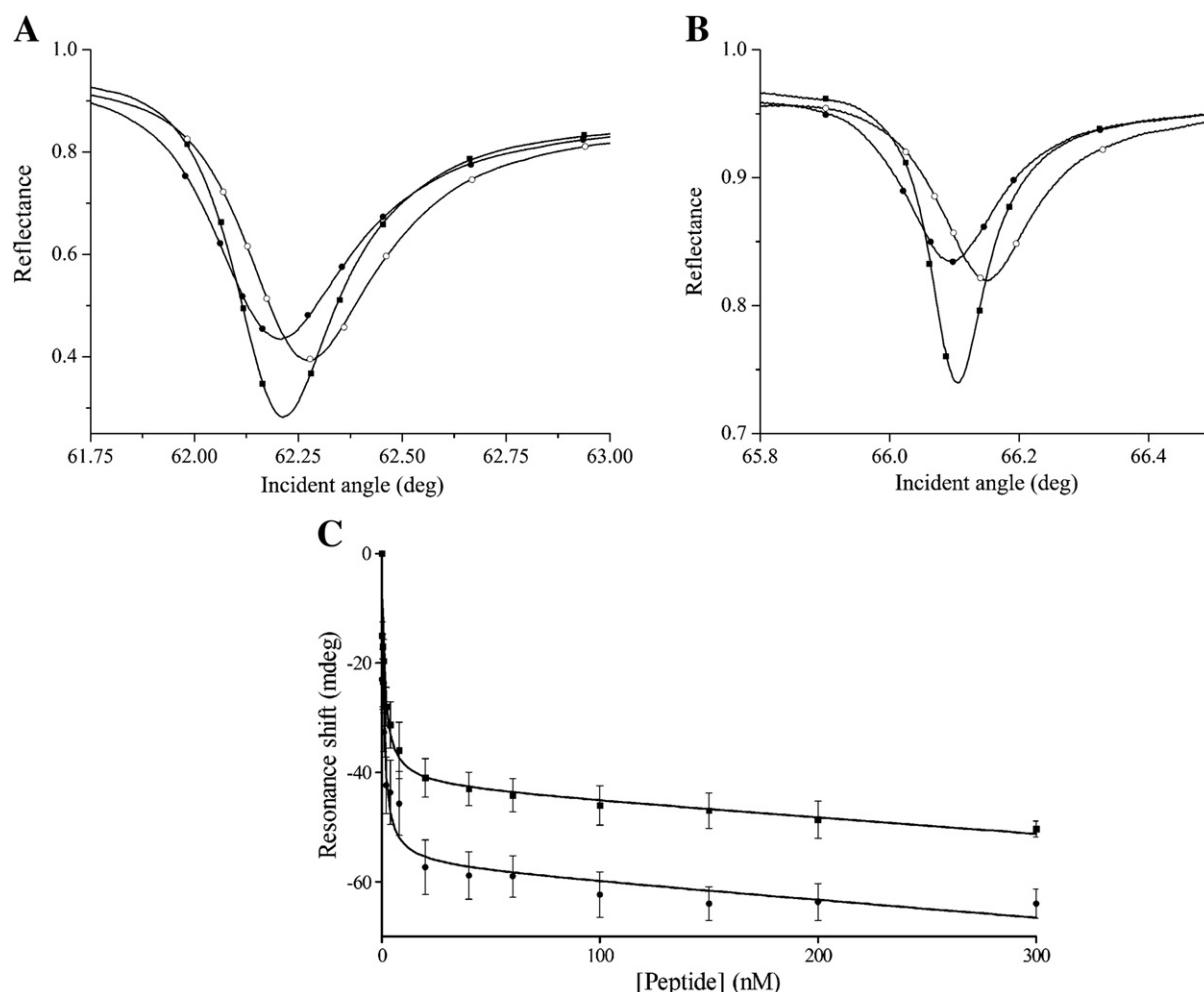
between electrostatic and hydrophobic forces. For a bilayer consisting of zwitterionic phospholipids, these peptides could possibly be inserted more deeply into the hydrophobic part of the bilayer (through the hydrophobic peptide face containing the Trp residues) causing an important leakage. In the case of negatively charged lipids, the electrostatic attraction between the peptide and the lipid (in this case the charged peptide face would be facing the lipid headgroups) could “immobilize” the peptide in the lipid headgroup region inhibiting a deeper insertion. Similar observations have previously been reported for the bee venom melittin [56].

### 3.4. Peptide affinity for the membrane

The affinity of RW16 for bilayers purely zwitterionic or composed of both anionic and zwitterionic lipids (eggPC/POPG and DOPC/DOPS) was studied by PWR (Fig. 5) and the resulting dissociation constants are presented in Table 4. Successive aliquots of RW16 solutions were added to the sample compartment of a PWR cell containing preformed bilayers composed of each of the different lipids used in these experiments. The signals observed before and after bilayer formation and upon saturating concentrations of peptide for *p*- and *s*-polarization are presented in Fig. 5 panels A and B, respectively. From these spectra we can get different information relative to the system deposited on the prism surface by analyzing the shift of the minimum of reflectance as a function of concentration or by fitting the spectra to obtain the optical parameters (for more details, see [57]). In all cases, PWR spectral changes were observed upon peptide addition to the membrane, indicating peptide interaction with the bilayers. In our case when the peptide is added to the bilayer we have observed a decrease in the mass of the system (as the angle of resonance decreases for both polarizations,  $\Delta\alpha < 0$ ) and a decrease of the thickness of the system (as the spectral depth decreases,  $\Delta R < 0$ ). A simple molecular interaction should lead to an increase in the resonance angle position as an increase in mass is produced by the interaction of additional molecules with the prism surface (increase in the refractive index). When this is not the case, it means that the peptide leads to a reorganization of the bilayer resulting in removal of part of the lipid mass from the membrane. Two explanations are possible for this scenario: the peptide has a detergent effect on the membrane, solubilizing part of the bilayer or the peptide leads to changes in the lipid properties resulting in a higher surface area occupied by each lipid molecule (and so a reduced mass per surface). At this stage it is not possible to distinguish between the two explanations.

A typical plot of the resonance angle changes for *p*- and *s*-polarization as a function of added concentrations of RW16 for an eggPC bilayer is shown in Fig. 5C. These points can be fitted through a hyperbolic function indicating that saturable binding occurred. Apparent dissociation constants are presented in Table 4. As mentioned above this experiment was conducted in bilayers purely zwitterionic and containing also anionic lipids. In all cases, RW16 induced shifts to smaller angles, indicating that in all cases a reorganization of the membrane occurred with a decrease in the mass of the system. Using Eqs. (2) and (3), the contributions of a pure mass effect and a pure structural effect to the spectra were calculated, indicating that mass changes accounted for 80–100% of the spectral changes (~100% in the case of eggPC and DOPC bilayers and ~90% and ~80% in the case of a mixture of DOPC/DOPS or eggPC/POPG bilayers, respectively). As for our surprise, the affinity constants obtained show that the affinity of RW16 for the lipids is mostly not affected by the lipid composition, being always in the low nM range. It is interesting to note that these values correlate very well with those obtained in calcein leakage experiments. Therefore, the dissociation constants observed by PWR reflect mostly the membrane perturbation exerted by the peptide on the membrane (pore formation or partial membrane disruption) rather than a simple membrane recognition (such as an electrostatic interaction between the positively charged amino acids in the peptide and the negatively lipid headgroups) which explains the lack of lipid specificity in the interactions. A decrease in





**Fig. 5.** Interaction of RW16 with an eggPC bilayer monitored by PWR. Panels A and B correspond to the PWR spectra obtained for the buffer (■), for the lipid bilayer (○) and after addition of 0.3 μM of RW16 to the bilayer (●) obtained for p- and s-polarized light, respectively. Experiments were performed with a spectral angular resolution of 1 mdeg. The shifts in the minimum of resonance upon incremental addition of peptide are presented in panel C for an eggPC bilayer. The points were fitted through a hyperbolic curve.

the bilayer thickness has been observed for other peptides and seems to be a common way of membrane destabilization by several membrane active peptides [58,59].

The affinity of RW16 to DOPG and DOPC LUVs was studied using Isothermal Titration Calorimetry. In these experiments RW16 solution (0.1 mM) was titrated with LUV solution (12.6 mM) and gradual injections were realized with 10 min interval between each injection to allow equilibrium. When DOPC vesicles were used no signal was observed (no heat exchange was developed for each injection; data not shown) contrarily to DOPG LUVs where a well defined exothermic signal was observed (Fig. 6A and B). An affinity in the micromolar range was determined from this data (Fig. 6, Table 5). The experiments have been done at different temperatures in order to determine the variation in the heat capacity ( $\Delta C_p$ , obtained from the slope of the linear fit)

that reveals important information regarding the nature of the peptide/lipid interactions. The temperature dependence of  $\Delta H$  is represented in Fig. 6C. The  $\Delta C_p$  is the sum of two terms resulting from the release of water from the hydrophilic and hydrophobic regions of the bilayer. When the  $\Delta C_p > 0$  typical of electrostatic interactions, the enthalpy is “favorable”, and when the  $\Delta C_p < 0$  the interaction is “entropy driven” and this is typical of hydrophobic interactions which means a transfer of a molecule from a polar to a nonpolar environment. The  $\Delta C_p$  observed is negative ( $-42$  kcal/mol/K) indicating that dehydration of hydrophobic regions of the bilayer is occurring during peptide interaction, hydrophobic interactions occupying an important role [60]. This correlates well with PWR results that have shown that the affinity of the peptide for lipids is not driven by the lipid charges. We have observed that the stoichiometry ( $n$ ) increases with the temperature. We hypothesized this to be due to a decrease in the oligomerization state of the peptide at increasing temperatures (peptide dissociation).

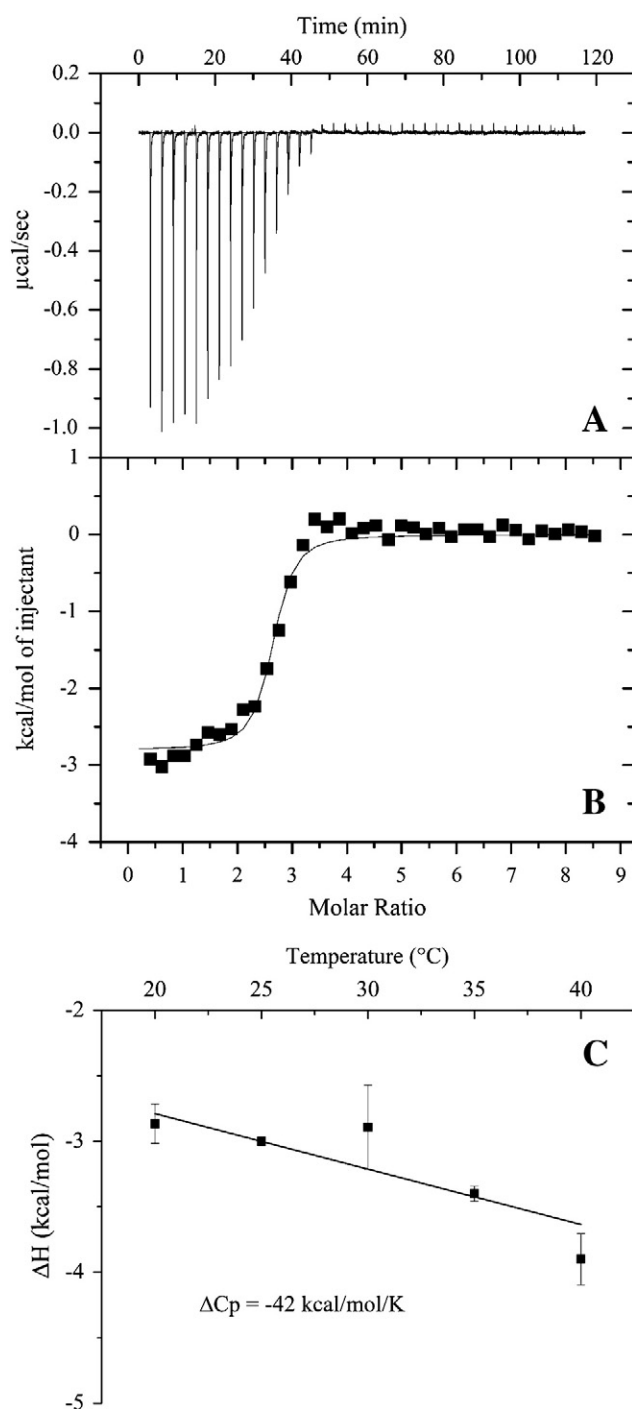
One important aspect to note concerns the difference in the binding affinity range observed in the different experiments (in the nanomolar range with PWR and calcein leakage experiments and in the micromolar range with ITC experiments). We are most certain that the disparity in these results arises from the different experimental conditions used, more specifically concerning peptide concentration and thus peptide oligomerization state. As the DLS studies show, RW16 behavior (in the absence of lipid) changes depending on its concentration, with peptide autoassociation occurring around 5 nM. In PWR and calcein leakage

**Table 4**

Dissociation constants of RW16 for different lipid bilayers as determined by PWR. The experiments have been done at least three times.

	p-Polarization (nM)	s-Polarization (nM)
EggPC	$1 \pm 0.3$	$1.4 \pm 0.4$
EggPC/POPG	$1.08 \pm 0.3$	$0.6 \pm 0.3$
DOPC	$1.68 \pm 0.4$	$2.15 \pm 0.6$
DOPC/DOPS	$2.2 \pm 0.6$	$1.2 \pm 0.5$





**Fig. 6.** Titration of the peptide solution (0.1 mM) with 2.5  $\mu$ L aliquots of DOPG LUVs (12.6 mM) (A) and the corresponding integrated signals (B) for a temperature of 20 °C. The temperature dependence of the binding enthalpy for the interaction between DOPG LUVs and RW16 is presented panel C. The  $\Delta C_p$  corresponds to the slope of the linear fit.

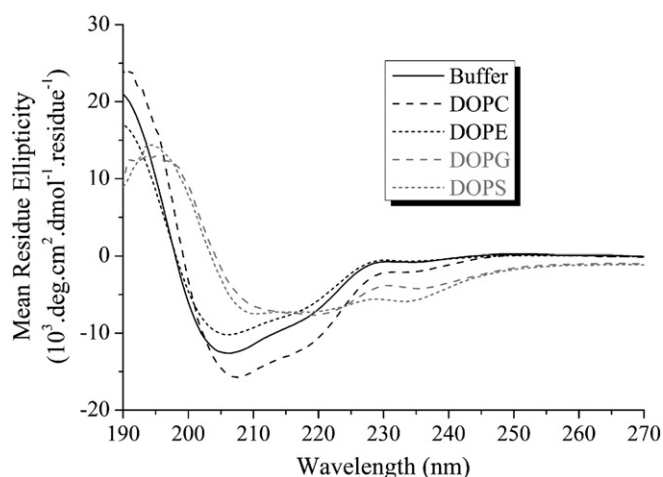
**Table 5**

Thermodynamic parameters obtained from the ITC experiments. The solution of peptide (0.1 mM) was titrated with the solution of DOPG liposomes (12.7 mM). The experiments have been performed at different temperatures and averaged over two experiments.

T (°C)	n	Kd ( $\mu$ M)	$\Delta H$ (cal/mol)	$\Delta S$ (cal/mol/°C)	$\Delta G$ (cal/mol)
20	2.32	1.7	−2866	16.6	−3198
25	3.4	1.3	−3004	16.8	−3424
30	3.7	6.7	−2892	14.1	−3315
35	6.8	2.7	−3403	14.4	−3907
40	6.7	18	−3976	9.02	−4337

experiments the peptide is added to the liposomes starting from low peptide concentrations (the peptide being in the monomer form) whereas in the ITC experiments the liposomes are added to the peptide that is at 0.1 mM so already auto-associated. While at low peptide concentrations, the peptide has both faces (hydrophilic and hydrophobic) exposed for lipid interaction and can therefore interact with both zwitterionic and anionic lipids with increased affinity (as observed in PWR studies), at higher peptide concentrations the peptide hydrophobic face is mostly buried (peptide autoassociation) and so the P/L interactions are mostly hydrophobic and so weaker (ITC results). This explains why no signal was observed in ITC using DOPC vesicles, while an interaction was observed by PWR. This will be further discussed in the conclusion section where a model is proposed to explain RW16 mode of action.

The fluorescence of Trp has been studied to follow the change in the Trp environment of RW16 following peptide/lipid interaction (Fig S1). RW16 fluorescence was monitored alone and upon contact with LUVs composed of either DOPC or DOPG or both DOPC/DOPG (8:2). The peptide concentration used was 0.5  $\mu$ M, concentration at which the peptide is oligomerized. In all cases a shift of the  $\lambda_{max}$  was observed toward lower wavelengths (called “blue-shift” or hypsochromic shift) and an increase of the fluorescence intensity occurred. A blue-shift reflects a change of environment of the Trp from a hydrophilic environment (buffer) to a hydrophobic environment due to membrane adsorption or insertion [61]. In a polar environment the  $\lambda_{max}$  is generally around 350 nm whereas in a nonpolar environment the  $\lambda_{max}$  is generally around 330–340 nm [61]. We have observed that in the presence of DOPG LUVs the final blue-shift is the same (from 347 nm to 338 nm; around 9 nm shift) but the concentration needed to reach the half-shift of the Trp emission spectrum is around ten times smaller in the case of DOPG LUVs than DOPC LUVs. This shift is consistent with the partitioning of the Trp side chain into a more hydrophobic, sterically confined environment. The change in the Trp environment to a more hydrophobic one can arise from peptide autoassociation where part of the Trp residues would be in contact with each other or from a burial of the Trp residue peptide in the lipid fatty acid chain region. At the concentration used here (0.5  $\mu$ M), the peptide should be in the oligomer form. We hypothesize that in the presence of DOPG LUVs the peptide interacts with the membrane through electrostatic interactions, the accumulation of peptide at the membrane surface will lead to strong peptide/peptide oligomer repulsion and to a strong membrane destabilization. To release some of this electrostatic repulsion between the peptide oligomers, some of the peptide molecules will flip, inserting the Trp residues deeper in the membrane which explains the blue-shift observed. In the case of DOPC, the same mechanism will take place, that is the flip of the peptide molecules with the insertion of Trp in the lipid fatty acid chain region (same magnitude of blue-shift observed), the only difference being that here the concentration at which this would take place is higher as there is no electrostatic attraction with the lipid. Up to a certain concentration, the peptide would stay in solution, always in the form of oligomer, at increasing concentrations the charge–charge repulsions between the peptide oligomers in solution increase and so the peptide interacts with the membrane and flips to insert the Trp residues in the membrane. This flip around the Arg residues has been reported to occur in parent peptides, RL9 and RW9 (also amphipathic and with the same amino acid distribution but shorter than RW16) by molecular dynamic simulation studies [62]. In the mixture of DOPC/DOPG the concentration needed to reach the same 9 nm blue-shift is around the same observed for DOPG vesicles. So overall, the explanation is the same as that proposed for DOPG but in the presence of a mixture of PC/PG it appears that there is a competition between zwitterionic and anionic lipids. These results correlate well with calcein leakage and DSC experiments where an enhanced lipid perturbation by the peptide in the presence of anionic lipids occurs. Furthermore these results correlate well with ITC experiments showing the importance of hydrophobic interaction between peptide and lipid, compared to electrostatic interactions.

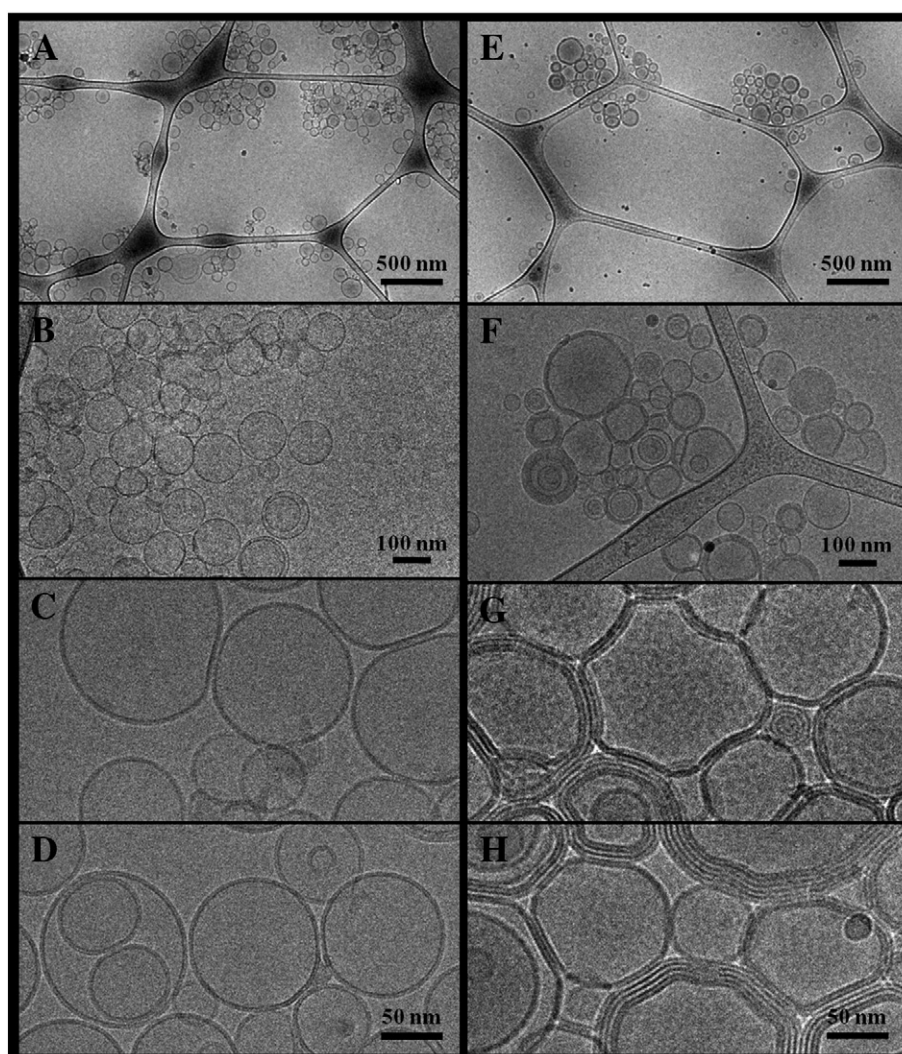


**Fig. 7.** CD spectra of RW16 in phosphate buffer and in the presence of LUVs of DOPC, DOPE, DOPG, and DOPS (1 mg/mL) at a P/L ratio of 1/25 (47  $\mu$ M of RW16).

### 3.5. Structure of the peptide in contact with membranes

To determine whether the interaction of RW16 with membranes leads to structural changes of the peptide, circular dichroism

experiments were performed in buffer (10 mM phosphate buffer) and in the presence of lipid vesicles of different compositions (zwitterionic DOPC or DOPE or anionic DOPG or DOPS LUVs) and at P/L ratios of 1/50, 1/25 and 1/10 (RW16 concentrations used varied from 24  $\mu$ M to 111  $\mu$ M). The peptide is thus in oligomeric form under all the conditions. The CD spectra are presented in Fig. 7. Analysis of CD spectra of RW16 in phosphate buffer demonstrated that the peptide is mostly structured in random coil (54%) and  $\alpha$ -helix (46%). In the presence of zwitterionic lipids (DOPC or DOPE) the peptide secondary structure does not change significantly. Indeed the percentage of random coil is about 40% and the percentage of helix is about 60% with DOPC whereas the percentage of random coil is about 60% and the percentage of helix is about 40% with DOPE. In the presence of anionic lipids (DOPG and DOPS) the peptide seems to change its structure into a  $\beta$ -sheet. Indeed in the presence of DOPG or DOPS liposomes the percentage of random coil is about 40%, the percentage of helix is about 20% and the percentage of  $\beta$ -sheet is about 40%. As evidenced by Trp fluorescence blue-shift, these results show that RW16 binding to anionic lipids leads to a different secondary structure. Such structural change in the presence of anionic lipids may be induced by the strong accumulation in the membrane of peptide oligomers possessing highly charged surfaces and thus leading to the formation of aggregates with alterations in the peptide secondary structure. The conformational changes under membrane binding observed in our case are similar to those found in the literature for penetratin and



**Fig. 8.** Cryo-TEM pictures of DOPC (A to D) and DOPG (E to H) LUVs (both at 1 mM) with RW16 at a P/L ratio of 1/25. Scale bars are: 500 nm for A and E, 100 nm for B and F, and 50 nm for C, D, G and H.

other CPPs [63]. In this study they have explained the dependence of  $\beta$ -structure on the vesicle surface charge density by peptide aggregation. The higher negative charge density may be more effective in neutralizing the electrostatic repulsion between the positively charged peptides, hence facilitating interactions between them.

One can note that a broad band appears at 230–233 nm in all the spectra and that anionic membrane binding increases the intensity of this band. In the literature, studies on Trp-rich antimicrobial peptides (e.g., indolicidin) have attributed this signal to the Trp side chains which can be either positive or negative depending on the orientation of the Trp residues and their solvent exposition [64–66].

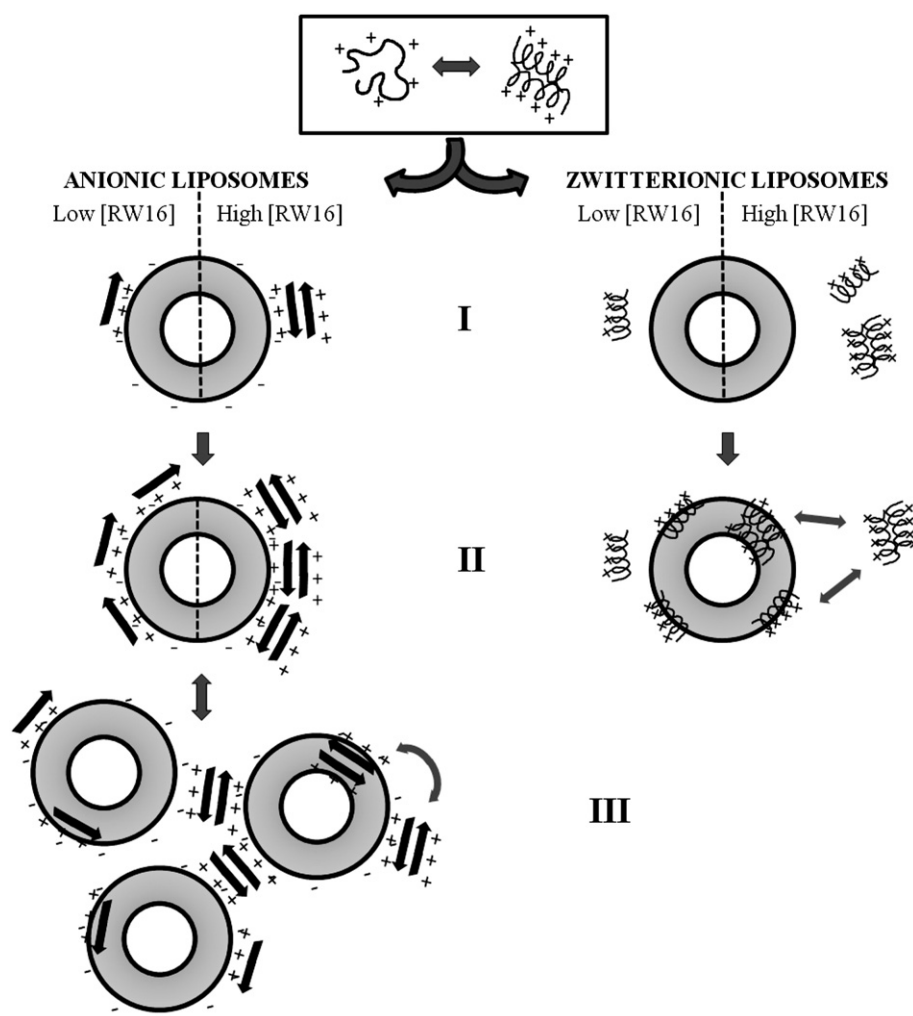
### 3.6. Cryo-TEM morphology analysis of liposomes in contact with the peptide

Cryo-TEM was used to provide morphological and supramolecular structural information on membrane-bound RW16 assemblies, principally in the context of its membrane-perturbation and aggregation properties. Fig. 8 shows the representative images of DOPC LUVs (Fig. 8A to D) and DOPG LUVs (Fig. 8E to H) both with RW16 at P/L of 1/25. Fig. 8C and D shows that the morphology of zwitterionic liposomes is not affected by peptide addition. In the case of anionic lipids the result is quite different, the peptide largely deforms liposome structures and promotes liposome adhesion with great perturbation in the liposome curvature (Fig. 8G and H). The peptide enhances the contacts

between the liposomes allowing them to deform and to create a more compacted arrangement. Thereby, the peptide acts as “glue” between anionic liposomes decreasing the membrane curvature tension. Another aspect that differs between the two liposomes concerns the general liposome distribution in the grid, while in the case of PC they appear more spreadly distributed (Fig. 8A) in the case of PG they are concentrated in more restricted areas and appear to form aggregates (Fig. 8E). Indeed one can observe that anionic vesicles are largely aggregated and this aggregation induced by RW16 leads to their deformation. Again, this enhanced membrane deformation observed in the case of anionic lipids agrees with the other studies presented. If one compares this data with previous data on penetratin [67,68], the peptide from which RW16 was derived, one can conclude that although both peptides highly perturb the lipid organization and membrane curvature, penetratin has a disordering effect on the membrane while RW16 seems to bring order in the membrane organization.

## 4. Conclusions

Herein, we have studied the interaction of a CPP with anti-tumor activity, RW16, with different lipid model systems. As mentioned above, RW16 has the capacity to autoassociate which changes and complicates data analysis. Equilibrium between the monomeric and oligomeric forms exists, low peptide concentrations (below 5 nM) favor the monomeric form and high concentrations (above 5 nM) favor



**Fig. 9.** Model proposed for the interaction of RW16 with zwitterionic vs anionic lipid model systems (left vs right panels) and for the peptide in its monomeric (low concentration, left part of the liposome) and oligomeric (high concentration, right part of the liposome) forms taking into consideration all experiments presented in this study. Discussion on the model can be found in the [Conclusions](#) section.



the oligomeric form (Fig. 9, top). The oligomerization leads to helical structure formation. The state of the peptide drastically changes its lipid interaction: in the monomer state the peptide can have both hydrophilic and hydrophobic areas exposed to solvent and so available for lipid interactions; in the oligomer state the peptide will mostly present its hydrophilic face (hydrophobic face will be mostly buried in the oligomer peptide core). This explains the disparity in the P/L affinity measured by PWR vs ITC experiments. Therefore, while at low nanomolar concentrations the peptide stays as a “monomer” and binds to the anionic membrane with rather strong affinity (~2 nM, PWR data), at micromolar concentrations the peptide is aggregated and binds with a lower affinity to the bilayer (in the micromolar range, ITC data) (Fig. 9, stage I, left panel). Binding of the peptide to anionic lipids would occur at first mainly by electrostatic interactions through the charged face of the peptide. This results in a non-favorable exposure of the hydrophobic face of the peptide. To deal with that the peptide either flips around the Arg residues to insert Trp residues in the membrane core or autoassociates to protect the hydrophobic face from the solvent. Peptide autoassociation leads to liposome aggregation (stages II and III, left panel in Fig. 9). Liposome aggregation can also result from the neutralization of the lipid surface charge by peptide binding, that decreases electrostatic repulsion leading to massive aggregation. The binding of the peptide to anionic lipids is accompanied by a conformation change to a  $\beta$ -sheet structure. In the presence of zwitterionic lipids, no binding was observed by ITC because the peptide is at high concentrations and so in the oligomer form, while in PWR an interaction is observed as the peptide is in the monomer form (Fig. 9, stage I, right panel). At increasing peptide concentrations, strong repulsions between the oligomers in solution may lead to the partial disruption of this oligomers and insertion in the membrane, the hydrophobic face of the peptide will be buried in the membrane (stage II, right panel, Fig. 9). The peptide remains  $\alpha$ -helical. Overall, the experiments demonstrate that electrostatic interactions are important for the interaction and so enhanced interactions and perturbations of anionic lipids are observed relative to zwitterionic ones. This comes logically after what was found previously regarding cationic cell-penetrating peptide. Less expected is the fact that in the P/L interaction the hydrophobic interactions rather than electrostatic ones seem to predominate. So, if the electrostatic interactions (between the Arg in the peptide and the polar lipid headgroups) are important for a first fast membrane contact (Fig. 9, stage I), once this stage is passed the hydrophobic contacts (probably between the Trp residues and the fatty acid chain region, following peptide flip) become important (Fig. 9, stage II). Equilibrium between flipped and non-flipped peptide is proposed which in the case of non-flipped peptide leads to a peptide oligomerization to protect the peptide hydrophobic surface from the solvent (Fig. 9, stage III, left panel). Indeed calorimetry studies demonstrate the importance of hydrophobic contacts and fluorescent studies suggest that in both types of lipids the Trp residues change to a more hydrophobic environment, so inserted in the fatty acid chain region. A deeper insertion of the peptide in zwitterionic vs anionic lipids is suggested by DSC studies, probably resulting from the fact that in anionic lipids the peptide may be retained more at the surface due to the electrostatic interactions with the lipid headgroups (Fig. 9, stage I left panel vs right panel). The accumulation of peptide in the membrane, either in its monomeric or oligomeric form, will create a mass imbalance in the membrane that can lead to the formation of pores or defects in the membrane allowing peptide passage. This step, in the case of anionic lipids, is accompanied by stronger membrane perturbations with liposome oligomerization (Fig. 9, stage III, left panel) and the formation of other type of lipid supra-molecular structures (as shown by Cryo-TEM). Aside from a preferential interaction with anionic lipids, RW16 would have the capacity of recruiting these lipids from binary lipid mixtures as shown by DSC. This is interesting when considering real cell membranes, for example from cancer cells that contain a few amounts of anionic lipids. When condensed in small domains these minor lipid components may present an increased potential. The enhanced interaction and perturbation observed

in RW16 interaction with anionic lipids is interesting when considering the reported potential of this peptide in selectively affecting the motility and intracellular actin-remodeling activity of tumor cells [10]. Cancer cell membranes being particularly more anionic than those of healthy cells due to the presence of anionic lipids in their outer leaflet (PS mainly) and overexpression in certain proteoglycans (also rich in negative charges), such enhanced effect of RW16 on anionic membranes may explain its potential as possible anticancer agent. Indeed recent studies pointed to a selectivity of certain CPPs to cancer cells and tumors [12–14].

Supplementary data to this article can be found online at <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbame.2013.02.008>.

## Acknowledgements

This work was supported by the French Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche. We thank Rodrigue Marquant from the LBM, UMR 7613 (University Pierre et Marie Curie) for RW16 peptide synthesis and purification. We thank R. Oda from the CBMN, UMR 5248 (University of Bordeaux 1) and C. Schatz from the LCPO, UMR 5629 (University of Bordeaux 1) for DLS measurements. We thank O. Lambert from the CBMN, UMR 5248 (University of Bordeaux 1) for the use of the Cryo-TEM and fruitful discussions.

## References

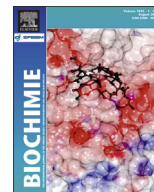
- [1] M. Zorko, U. Langel, Cell-penetrating peptides: mechanism and kinetics of cargo delivery, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 57 (2005) 529–545.
- [2] G.P. Dietz, M. Bahr, Delivery of bioactive molecules into the cell: the Trojan horse approach, *Mol. Cell. Neurosci.* 27 (2004) 85–131.
- [3] C. Foerg, H.P. Merkle, On the biomedical promise of cell penetrating peptides: limits versus prospects, *J. Pharm. Sci.* 97 (2008) 144–162.
- [4] E. Gros, S. Deshayes, M.C. Morris, G. Aldrian-Herrada, J. Depollier, F. Heitz, G. Divita, A non-covalent peptide-based strategy for protein and peptide nucleic acid transduction, *Biochim. Biophys. Acta* 1758 (2006) 384–393.
- [5] S. Moschos, A. Williams, M. Lindsay, In vivo applications of cell-penetrating peptide, in: U. Langel (Ed.), *Cell-Penetrating Peptides*, CRC Press, Boca Raton, 2007, pp. 423–438.
- [6] L.N. Patel, J.L. Zaro, W.C. Shen, Cell penetrating peptides: intracellular pathways and pharmaceutical perspectives, *Pharm. Res.* 24 (2007) 1977–1992.
- [7] A.T. Jones, E.J. Sayers, Cell entry of cell penetrating peptides: tales of tails wagging dogs, *J. Control. Release* 161 (2012) 582–591.
- [8] H.A. Rydberg, M. Matson, H.L. Amand, E.K. Esbjornner, B. Norden, Effects of tryptophan content and backbone spacing on the uptake efficiency of cell-penetrating peptides, *Biochemistry* 51 (27) (2012) 5531–5539.
- [9] D. Derossi, G. Chassaing, A. Prochiantz, Trojan peptides: the penetratin system for intracellular delivery, *Trends Cell Biol.* 8 (1998) 84–87.
- [10] D. Delaroche, F.X. Cantrelle, F. Subra, C. Van Heijenoort, E. Guittet, C.Y. Jiao, L. Blanchoin, G. Chassaing, S. Lavielle, C. Auclair, S. Sagan, Cell-penetrating peptides with intracellular actin-remodeling activity in malignant fibroblasts, *J. Biol. Chem.* 285 (2010) 7712–7721.
- [11] A. Lamaziere, F. Burlina, C. Wolf, G. Chassaing, G. Trugnan, J. Ayala-Sanmartin, Non-metabolic membrane tubulation and permeability induced by bioactive peptides, *PLoS One* 2 (2007) e201.
- [12] S. Richter, V. Bouvet, M. Wuest, R. Bergmann, J. Steinbach, J. Pietzsch, I. Neundorff, F. Wuest, (18)F-Labeled phosphopeptide-cell-penetrating peptide dimers with enhanced cell uptake properties in human cancer cells, *Nucl. Med. Biol.* 39 (8) (2012) 1202–1212.
- [13] I. Nakase, Y. Konishi, M. Ueda, H. Saji, S. Futaki, Accumulation of arginine-rich cell-penetrating peptides in tumors and the potential for anticancer drug delivery in vivo, *J. Control. Release* 159 (2012) 181–188.
- [14] E. Kondo, K. Saito, Y. Tashiro, K. Kamide, S. Uno, T. Furuya, M. Mashita, K. Nakajima, T. Tsumuraya, N. Kobayashi, M. Nishibori, M. Tanimoto, M. Matsushita, Tumour lineage-homing cell-penetrating peptides as anticancer molecular delivery systems, *Nat. Commun.* 3 (2012) 951.
- [15] J.H. Lee, H. Park, H. Chung, S. Choi, Y. Kim, H. Yoo, T.Y. Kim, H.J. Hann, I. Seong, J. Kim, K.G. Kang, I.O. Han, E.S. Oh, Syndecan-2 regulates the migratory potential of melanoma cells, *J. Biol. Chem.* 284 (2009) 27167–27175.
- [16] K. Matsuda, H. Maruyama, F. Guo, J. Kleeff, J. Itakura, Y. Matsumoto, A.D. Lander, M. Korc, Glypican-1 is overexpressed in human breast cancer and modulates the mitogenic effects of multiple heparin-binding growth factors in breast cancer cells, *Cancer Res.* 61 (2001) 5562–5569.
- [17] R.D. Sanderson, Heparan sulfate proteoglycans in invasion and metastasis, *Semin. Cell Dev. Biol.* 12 (2001) 89–98.
- [18] I. Vlodavsky, O. Goldshmidt, E. Zcharia, R. Atzmon, Z. Rangini-Guatta, M. Elkin, T. Peretz, Y. Friedmann, Mammalian heparanase: involvement in cancer metastasis, angiogenesis and normal development, *Semin. Cancer Biol.* 12 (2002) 121–129.

- [19] S.J. Martin, C.P. Reutelingsperger, A.J. McGahon, J.A. Rader, R.C. van Schie, D.M. LaFace, D.R. Green, Early redistribution of plasma membrane phosphatidylserine is a general feature of apoptosis regardless of the initiating stimulus: inhibition by overexpression of Bcl-2 and Abl, *J. Exp. Med.* 182 (1995) 1545–1556.
- [20] S.T. Henriques, M.N. Melo, M.A. Castanho, Cell-penetrating peptides and antimicrobial peptides: how different are they? *Biochem. J.* 399 (2006) 1–7.
- [21] I.D. Alves, N. Goasdoue, I. Correia, S. Aubry, C. Galanth, S. Sagan, S. Lavielle, G. Chassaing, Membrane interaction and perturbation mechanisms induced by two cationic cell penetrating peptides with distinct charge distribution, *Biochim. Biophys. Acta* 1780 (2008) 948–959.
- [22] J.S. Bahnsen, H. Franzyk, A. Sandberg-Schaal, H.M. Nielsen, Antimicrobial and cell-penetrating properties of penetratin analogs: effect of sequence and secondary structure, *Biochim. Biophys. Acta* 1828 (2013) 223–232.
- [23] C. Palm, S. Netzereab, M. Hallbrink, Quantitatively determined uptake of cell-penetrating peptides in non-mammalian cells with an evaluation of degradation and antimicrobial effects, *Peptides* 27 (2006) 1710–1716.
- [24] K. Splith, I. Neundorff, Antimicrobial peptides with cell-penetrating peptide properties and vice versa, *Eur. Biophys. J.* 40 (2011) 387–397.
- [25] P. Wadhvani, R.F. Epand, N. Heidenreich, J. Burck, A.S. Ulrich, R.M. Epand, Membrane-active peptides and the clustering of anionic lipids, *Biophys. J.* 103 (2012) 265–274.
- [26] N. Papo, Y. Shai, New lytic peptides based on the D,L-amphipathic helix motif preferentially kill tumor cells compared to normal cells, *Biochemistry* 42 (2003) 9346–9354.
- [27] S.A. Johnstone, K. Gelmon, L.D. Mayer, R.E. Hancock, M.B. Bally, In vitro characterization of the anticancer activity of membrane-active cationic peptides. I. Peptide-mediated cytotoxicity and peptide-enhanced cytotoxic activity of doxorubicin against wild-type and p-glycoprotein over-expressing tumor cell lines, *Anticancer Drug Des.* 15 (2000) 151–160.
- [28] F.S. Kao, Y.R. Pan, R.Q. Hsu, H.M. Chen, Efficacy verification and microscopic observations of an anticancer peptide, CB1a, on single lung cancer cell, *Biochim. Biophys. Acta* 1818 (2012) 2927–2935.
- [29] M. Amiche, A.A. Seon, H. Wroblewski, P. Nicolas, Isolation of dermatoxin from frog skin, an antibacterial peptide encoded by a novel member of the dermaseptin genes family, *Eur. J. Biochem.* 267 (2000) 4583–4592.
- [30] P. Bonnafont, T. Stegmann, Membrane perturbation and fusion pore formation in influenza hemagglutinin-mediated membrane fusion. A new model for fusion, *J. Biol. Chem.* 275 (2000) 6160–6166.
- [31] G. Rouser, S. Fleischer, A. Yamamoto, Two dimensional thin layer chromatographic separation of polar lipids and determination of phospholipids by phosphorus analysis of spots, *Lipids* 5 (1970) 494–496.
- [32] T. Pott, E.J. Dufourc, Action of melittin on the DPPC-cholesterol liquid-ordered phase: a solid state <sup>2</sup>H- and <sup>31</sup>P-NMR study, *Biophys. J.* 68 (1995) 965–977.
- [33] P. Mueller, D.O. Rudin, H.T. Tien, W.C. Wescott, Reconstitution of cell membrane structure in vitro and its transformation into an excitable system, *Nature* 194 (1962) 979–980.
- [34] Z. Salamon, G. Tollin, I. Alves, V. Hruby, Chapter 6. Plasmon resonance methods in membrane protein biology applications to GPCR signaling, *Methods Enzymol.* 461 (2009) 123–146.
- [35] I.D. Alves, S.M. Cowell, Z. Salamon, S. Devanathan, G. Tollin, V.J. Hruby, Different structural states of the proteolipid membrane are produced by ligand binding to the human delta-opioid receptor as shown by plasmon-waveguide resonance spectroscopy, *Mol. Pharmacol.* 65 (2004) 1248–1257.
- [36] Z. Salamon, G. Tollin, Graphical analysis of mass and anisotropy changes observed by plasmon-waveguide resonance spectroscopy can provide useful insights into membrane protein function, *Biophys. J.* 86 (2004) 2508–2516.
- [37] I.D. Alves, I. Correia, C.Y. Jiao, E. Sachon, S. Sagan, S. Lavielle, G. Tollin, G. Chassaing, The interaction of cell-penetrating peptides with lipid model systems and subsequent lipid reorganization: thermodynamic and structural characterization, *J. Pept. Sci.* 15 (2009) 200–209.
- [38] S. Devanathan, Z. Salamon, G. Tollin, J. Fitch, T.E. Meyer, M.A. Cusanovich, Binding of oxidized and reduced cytochrome c2 to photosynthetic reaction centers: plasmon-waveguide resonance spectroscopy, *Biochemistry* 43 (2004) 16405–16415.
- [39] P. Lecorche, A. Walrant, F. Burlina, L. Dutot, S. Sagan, J.M. Mallet, B. Desbat, G. Chassaing, I.D. Alves, S. Lavielle, Cellular uptake and biophysical properties of galactose and/or tryptophan containing cell-penetrating peptides, *Biochim. Biophys. Acta* 1818 (2012) 448–457.
- [40] H. Binder, G. Lindblom, Charge-dependent translocation of the Trojan peptide penetratin across lipid membranes, *Biophys. J.* 85 (2003) 982–995.
- [41] A. Ziegler, J. Seelig, Contributions of glycosaminoglycan binding and clustering to the biological uptake of the nonamphipathic cell-penetrating peptide WR9, *Biochemistry* 50 (2011) 4650–4664.
- [42] A. Ziegler, J. Seelig, Binding and clustering of glycosaminoglycans: a common property of mono- and multivalent cell-penetrating compounds, *Biophys. J.* 94 (2008) 2142–2149.
- [43] J.M. Seddon, Structure of the inverted hexagonal (HII) phase, and non-lamellar phase transitions of lipids, *Biochim. Biophys. Acta* 1031 (1990) 1–69.
- [44] D.I. Chan, E.J. Prenner, H.J. Vogel, Tryptophan- and arginine-rich antimicrobial peptides: structures and mechanisms of action, *Biochim. Biophys. Acta* 1758 (2006) 1184–1202.
- [45] D. Lichtenberg, E. Freire, C.F. Schmidt, Y. Barenholz, P.L. Felgner, T.E. Thompson, Effect of surface curvature on stability, thermodynamic behavior, and osmotic activity of dipalmitoylphosphatidylcholine single lamellar vesicles, *Biochemistry* 20 (1981) 3462–3467.
- [46] S. Thennarasu, A. Tan, R. Penumatchu, C.E. Shelburne, D.L. Heyl, A. Ramamoorthy, Antimicrobial and membrane disrupting activities of a peptide derived from the human cathelicidin antimicrobial peptide LL37, *Biophys. J.* 98 (2010) 248–257.
- [47] Y.P. Zhang, R.N. Lewis, R.S. Hodges, R.N. McElhaney, Interaction of a peptide model of a hydrophobic transmembrane alpha-helical segment of a membrane protein with phosphatidylcholine bilayers: differential scanning calorimetric and FTIR spectroscopic studies, *Biochemistry* 31 (1992) 11579–11588.
- [48] R.F. Epand, M.A. Schmitt, S.H. Gellman, R.M. Epand, Role of membrane lipids in the mechanism of bacterial species selective toxicity by two alpha/beta-antimicrobial peptides, *Biochim. Biophys. Acta* 1758 (2006) 1343–1350.
- [49] R.F. Epand, G. Wang, B. Berno, R.M. Epand, Lipid segregation explains selective toxicity of a series of fragments derived from the human cathelicidin LL-37, *Antimicrob. Agents Chemother.* 53 (2009) 3705–3714.
- [50] R.M. Epand, R.F. Epand, C.J. Arnusch, B. Papahadjopoulos-Sternberg, G. Wang, Y. Shai, Lipid clustering by three homologous arginine-rich antimicrobial peptides is insensitive to amino acid arrangement and induced secondary structure, *Biochim. Biophys. Acta* 1798 (2010) 1272–1280.
- [51] P. Joanne, C. Galanth, N. Goasdoue, P. Nicolas, S. Sagan, S. Lavielle, G. Chassaing, C. El Amri, I.D. Alves, Lipid reorganization induced by membrane-active peptides probed using differential scanning calorimetry, *Biochim. Biophys. Acta* 1788 (2009) 1772–1781.
- [52] B.J. Potter, T.A. McHugh, O. Beloqui, Iron uptake from transferrin and asialotransferrin by hepatocytes from chronically alcohol-fed rats, *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 16 (1992) 810–815.
- [53] H. Leontiadou, A.E. Mark, S.J. Marrink, Antimicrobial peptides in action, *J. Am. Chem. Soc.* 128 (2006) 12156–12161.
- [54] C.F. Lopez, S.O. Nielsen, G. Srinivas, W.F. Degrad, M.L. Klein, Probing membrane insertion activity of antimicrobial polymers via coarse-grain molecular dynamics, *J. Chem. Theory Comput.* 2 (2006) 649–655.
- [55] L.E. Yandek, A. Pokorny, A. Floren, K. Knoelke, U. Langel, P.F. Almeida, Mechanism of the cell-penetrating peptide transportan 10 permeation of lipid bilayers, *Biophys. J.* 92 (2007) 2434–2444.
- [56] D.K. Hinch, J.H. Crowe, The lytic activity of the bee venom peptide melittin is strongly reduced by the presence of negatively charged phospholipids or chloroplast galactolipids in the membranes of phosphatidylcholine large unilamellar vesicles, *Biochim. Biophys. Acta* 1284 (1996) 162–170.
- [57] Z. Salamon, G. Tollin, Optical anisotropy in lipid bilayer membranes: coupled plasmon-waveguide resonance measurements of molecular orientation, polarizability, and shape, *Biophys. J.* 80 (2001) 1557–1567.
- [58] W.T. Heller, A.J. Waring, R.I. Lehrer, T.A. Harroun, T.M. Weiss, L. Yang, H.W. Huang, Membrane thinning effect of the beta-sheet antimicrobial protegrin, *Biochemistry* 39 (2000) 139–145.
- [59] A. Mecke, D.K. Lee, A. Ramamoorthy, B.G. Orr, M.M. Banaszak Holl, Membrane thinning due to antimicrobial peptide binding: an atomic force microscopy study of MSI-78 in lipid bilayers, *Biophys. J.* 89 (2005) 4043–4050.
- [60] P. Garidel, A. Blume, Interaction of alkaline earth cations with the negatively charged phospholipid 1,2-dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphoglycerol: a differential scanning and isothermal titration calorimetric study, *Langmuir* 15 (1999) 9.
- [61] E. Barany-Wallje, S. Keller, S. Serowy, S. Geibel, P. Pohl, M. Bienert, M. Dathe, A critical reassessment of penetratin translocation across lipid membranes, *Biophys. J.* 89 (2005) 2513–2521.
- [62] A. Walrant, A. Vogel, I. Correia, O. Lequin, B.E. Olausson, B. Desbat, S. Sagan, I.D. Alves, Membrane interactions of two arginine-rich peptides with different cell internalization capacities, *Biochim. Biophys. Acta* 1818 (2012) 1755–1763.
- [63] M. Magzoub, L.E. Eriksson, A. Graslund, Conformational states of the cell-penetrating peptide penetratin when interacting with phospholipid vesicles: effects of surface charge and peptide concentration, *Biochim. Biophys. Acta* 1563 (2002) 53–63.
- [64] R.W. Woody, Contributions of tryptophan side chains to the far-ultraviolet circular dichroism of proteins, *Eur. Biophys. J.* 23 (1994) 253–262.
- [65] A.S. Ladokhin, M.E. Selsted, S.H. White, CD spectra of indolicidin antimicrobial peptides suggest turns, not polyproline helix, *Biochemistry* 38 (1999) 12313–12319.
- [66] V.V. Andrushchenko, H.J. Vogel, E.J. Prenner, Solvent-dependent structure of two tryptophan-rich antimicrobial peptides and their analogs studied by FTIR and CD spectroscopy, *Biochim. Biophys. Acta* 1758 (2006) 1596–1608.
- [67] A. Lamaziere, C. Wolf, O. Lambert, G. Chassaing, G. Trugnan, J. Ayala-Sanmartin, The homeodomain derived peptide penetratin induces curvature of fluid membrane domains, *PLoS One* 3 (2008) e1938.
- [68] A. Lamaziere, O. Maniti, C. Wolf, O. Lambert, G. Chassaing, G. Trugnan, J. Ayala-Sanmartin, Lipid domain separation, bilayer thickening and pearling induced by the cell penetrating peptide penetratin, *Biochim. Biophys. Acta* 1798 (2010) 2223–2230.



Contents lists available at ScienceDirect

Biochimie

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/biochi](http://www.elsevier.com/locate/biochi)

## Mini-review

# On the importance of electrostatic interactions between cell penetrating peptides and membranes: A pathway toward tumor cell selectivity?

Marie-Lise Jobin, Isabel D. Alves\*

CBMN-Univ Bordeaux, UMR 5248, Allée Geoffroy St Hilaire, 33600 Pessac, France

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 27 May 2014

Accepted 26 July 2014

Available online xxx

## Keywords:

Cell penetrating peptides

Electrostatic interactions

Tumor cell specificity

Peptide/lipid interactions

## ABSTRACT

Cell-penetrating peptides (CPPs) are small molecules of major interest due to their ability to efficiently transport cargos across cell membranes in a receptor- and energy-independent way and without being cytotoxic to cells. Since their discovery 20 years ago their potential interest in drug delivery and diagnosis became undeniable. CPPs are being used to deliver inside cells a large variety of cargos such as proteins, DNA, antibodies, imaging agents and nanoparticle drug carriers. Their cellular uptake mechanisms are still debated and may vary depending on their structure, nature and size of cargo they transport and type of cell line targeted. CPPs are generally rich in positively charged residues, thus they are prone to establish electrostatic interactions with anionic membrane components (sugars and lipids). Understanding the molecular basis of CPP membrane interaction and cellular uptake is crucial to improve their *in vivo* efficiency target-specificity. A great number of studies demonstrated the high potential of CPPs to translocate efficiently therapeutic cargos into cells and some peptides are even in clinical phase studies. Although these molecules seem perfect for a therapeutic or diagnosis purpose, they still possess a small but non negligible drawback: a complete lack of cell type specificity. Tumor cells have recently been shown to over-express certain glycosaminoglycans at the cell membrane surface and to possess a higher amount of anionic lipids in their outer leaflet than healthy cells. Such molecules confer the cell membrane an enhanced anionic character, property that could be used by CPPs to selectively target these cells. Moreover previous studies demonstrate the importance of electrostatic interactions between basic residues in the peptide, especially Arg, and the lipid headgroups and glycosaminoglycans in the cell membrane. Electrostatic interactions put at stake in this process might be one of the keys to resolve the puzzle of CPP cell type specificity.

© 2014 Published by Elsevier Masson SAS.

## 1. Introduction

CPPs have gained much attention these last 20 years since they have a great potential for medical applications. These small molecules can be internalized into cells in a receptor- and energy-independent way and without toxicity to the cells. They can deliver hydrophilic and macromolecular cargos inside eukaryotic cells efficiently without causing significant damage to the cell

membrane thus allowing the transport of therapeutic or imaging agents into cells (for a review, see Ref. [1]). The cellular internalization of these peptides has been well studied and proved their efficacy toward a large panel of cells [2]. Although highly efficient in mediating the cellular uptake of different molecules into most cell lines, the use of CPPs appears much more limited to the *in vivo* use mainly because of a complete lack of cell type specificity [3]. Indeed, most of the current anticancer drugs are unable to differentiate between tumoral and healthy cells, leading to systemic toxicity, and thus negative side effects.

The mechanism by which CPPs internalize into cells has been deeply investigated and has given rise to much debate in the literature. Nonetheless a common consensus has emerged and has generally been accepted proposing that multiple mechanisms of cellular internalization intervene. Endocytosis and direct

**Abbreviations:** CPP, cell penetrating peptides; DNA, deoxyribonucleic acid; GAG, glycosaminoglycans; HSPG, heparan sulfate proteoglycans; NP, nanoparticles; SAR, structure/activity relationship.

\* Corresponding author. CBMN-UMR 5248 CNRS, Université de Bordeaux, IPB, Allée Geoffroy St. Hilaire 33600 Pessac, France. Tel.: +33 5 40 00 68 49.

E-mail addresses: [ml.jobin@cbmn.u-bordeaux.fr](mailto:ml.jobin@cbmn.u-bordeaux.fr) (M.-L. Jobin), [i.alves@cbmn.u-bordeaux.fr](mailto:i.alves@cbmn.u-bordeaux.fr) (I.D. Alves).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.biochi.2014.07.022>

0300-9084/© 2014 Published by Elsevier Masson SAS.



translocation through the membrane can occur depending on the peptide secondary structure, its concentration surrounding the membranes, the type and size of cargo they transport among other properties and experimental conditions [4]. In terms of the cell membrane, selective barrier that the CPPs encounter and need to cross, two families of molecules need to be considered in the understanding of their action mechanism: 1) glycosaminoglycans (GAGs) that have often been shown to be involved in the process of endocytosis among many other different regulating and signaling processes of the cells [5] and 2) lipids whose properties and organization upon peptide interaction have been investigated to shed light into mechanisms of direct translocation of CPPs through the membrane [6–11].

Recent studies have shown that the cell membranes of tumoral and healthy cells differ both in their GAGs and lipid composition and thus such biomarkers could be used to improve CPP selectivity toward cancer cells vs healthy ones. The differences in terms of membrane composition between healthy and tumor cells result in an enhanced anionic character for tumoral cell membranes. Considering the important role of electrostatic interactions between positively charged CPPs and the negative charges in the cell membrane, such aspect can be exploited to confer a certain degree of selectivity to CPPs, a property yet lacking for their therapeutic application. Herein we will discuss on the potential of certain CPPs to preferentially bind more anionic membranes rendering them with a “tumor-homing” potential.

## 2. The cellular membrane: clever customs

Cellular membrane studies are complex due to the high diversity of lipids and proteins present at the cell membrane surface. Cellular membrane is the barrier that protects the cells from external agents but also allows, in a selective manner, molecules to cross them and to be transported to their interior. The membrane is composed of a large variety of lipids, proteins and sugars. Phospholipids are the most abundant molecules in membranes and they play both a structural function and a functional role in regulating and controlling the processes occurring throughout the membrane. GAGs are present in all animal tissues and bind to a large variety of proteins like heparin or growth factors, molecules of the extracellular matrix or molecules implicated in cell adhesion [5,12]. Binding of these proteins triggers multiple and varied functions inside the cells like cell division, angiogenesis, defense mechanisms or endocytosis [13,14]. In the study of the internalization mechanism of CPPs both GAGs and lipids need to be considered to fully understand the system.

Cellular uptake studies at low temperature (4 °C), with a lack of energy (e.g. ATP depletion) or using D-isomer peptides have shown that CPP cellular uptake is both energy- and receptor-independent [15]. However the cellular uptake mechanisms of CPPs depend on a great variety of parameters such as the nature and size of the CPP and its cargo, the nature of the link between the two, the temperature at which internalization experiments are conducted, the cell lines used, among others parameters [16,17]. Direct translocation through the membrane was first evoked as the mechanism of internalization of CPPs, then refuted as an artifact of fixation and later confirmed using fluorescence in living cells [18,19]. This mechanism involves destabilization of the plasma membrane and while endocytosis is inhibited at 4 °C, direct translocation is also decreased because membrane dynamics and fluidity are affected at such low temperature. Thus, assessing direct translocation at low temperatures in living cells leads to an under-estimation of this latter. In fact, to access and study CPP direct translocation through membranes, the use of lipid model systems such as liposomes is ideal and has been widely employed [20]. Direct translocation can

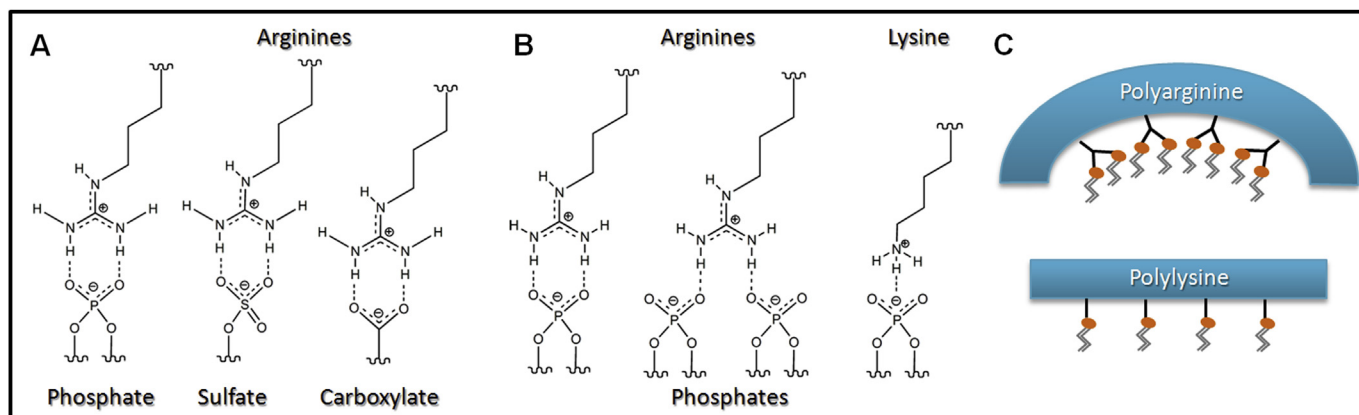
occur by different pathways like adaptive translocation, inverted micelle or the pore formation model [7]. Despite a lot of controversy and debate, it is now mainly accepted that both endocytosis and direct translocation through the membrane are implicated in CPP internalization mechanisms [6,7,21]. HSPGs at the cell membrane surface play an important role in these mechanisms.

The presence of HSPGs carboxyl and sulfates moieties strongly contributes to the polyanionic character of cell membranes. They act as an “electrostatic trap” for cationic molecules that are close to the membrane allowing certain of these molecules to penetrate into cells. This joins the finding reported half a century ago that polybasic peptides increase cellular internalization of proteins in culture cells [22]. Moreover it was shown that reticulation of proteins with GAGs increased cellular internalization of CPPs [23]. Many years later it was proven that GAGs deletion at the cell membrane surface decreases or prevents cellular internalization of CPPs [10,24,25]. This demonstrates that CPP internalization capacity depends on the type of interaction established between peptide and membrane lipids rather than the simple presence of positive charged residues in CPPs. Biophysical studies on model systems performed by Seelig and others point to the importance of electrostatic interactions between CPPs and GAGs [10,18,26]. HSPG expression is developmentally regulated and altered in various pathophysiological processes, including cancer. It was observed that GAGs HSPGs are expressed at the healthy cell membrane surface and they were shown to be over expressed at the surface of cancer cells [13,14,27–29]. Indeed the capacity of HSPGs to interact with either soluble ligands or the matrix architecture defines multiple combinations of properties that enable healthy cells to sense and respond to, controlling environmental events. Cancer cells employ various mechanisms to exploit these properties and gain a survival advantage.

For example, the syndecan SDC4 was shown to decrease tumor cell ability to migrate through the regulation of its activator, one of the most expressed growth factor in melanoma cells, the fibroblast growth factor FGF-2 [30]. Concerning the GPI anchored glypicans it has been shown that over-expression of the GPC3 glypican in hepatocellular carcinoma and melanoma induces tumor growth signaling upon binding of its HS chains to Hedgehog and Wnt proteins [31]. Overall, tumor cells have been shown to over-express certain types of proteoglycans such as glypicans and syndecans that are implicated in several aspects of tumorigenesis such as cell adhesion, growth and motility [28,32–34]. The higher abundance of certain types of GAGs in tumoral cells relative to healthy ones could be used to improve CPP selectivity by taking advantage of enhanced electrostatic interactions through their positively charged amino acids.

In what concerns the lipid component in the cell membrane, many studies on model membranes have well characterized and allowed a good understanding of the mode of interaction of CPPs with membranes [35–37]. As per the lipid composition of different cell lines, and especially tumoral vs healthy ones, subtle but quite consistent and important differences have been reported. Indeed, during cancer development the lipid composition of the cell membrane is strongly modified and different types of cancer have been associated with unique membrane lipid compositions [38].

Phosphatidylserine (PS), an anionic lipid normally present only in the membrane inner leaflet, has been shown to be important during the process of cells apoptosis [39]. Indeed this lipid acts as a stress signaling at the cell membrane surface and is recognized by phagocytes. This signal acts as an efficient recognition factor as soon as phagocytes are close to the membrane. The PS expressed at the proliferative cells membrane surface is thus a marker for angiogenic blood vessels [40] and is also a receptor of interest for diagnosis of apoptotic cells and targeting of cancer cells whose



**Fig. 1.** (A) Different binding sites at the membrane surface for Arg-rich CPP interaction. (B) Differences in phosphate binding mechanism of Arg and Lys residues. (C) Resulting lipid membrane curvature after binding of polyArg or polyLys. Figure adapted from Ref. [74].

negative charges accumulate at the cell membrane surface. Indeed it was demonstrated that tumor cells increase the PS content of the outer leaflet cell membrane (up to 8 fold increase) relative to the outer leaflet of healthy cells [41,42]. These data suggest a correlation between expression of PS on the outer leaflet of target cell membranes and their recognition by macrophages [41,42]. The PS being an anionic lipid, contrarily to zwitterionic lipids that are major components in healthy cells, its presence renders tumoral cell membranes considerably more anionic. Yet another aspect that differs between tumoral and healthy membranes is their fluidity which is higher for tumoral membranes, that could render these membranes more prone to peptide insertion and crossing [43].

Overall, reported literature demonstrates that tumor cells have a considerably higher propensity to expose negative charges at its membrane surface than healthy cells. These survival properties can be derived and used against cancer cells as further described in the next sections.

### 3. Arginines: key residues for CPP cell entry

The importance of cationic residues in CPP amino acid sequence was first highlighted with Tat peptide (48–60; GRKKRRQRRPPQ) which derives from 86-mer HIV-Tat protein that possesses a high number of basic residues in its amino acid sequence [44,45]. It was evidenced that positive charges are important for the cellular uptake of this peptide. By varying the peptide amino acid length, the optimal number of Arg residues was investigated by Mitchell et al., showing that cellular internalization efficiency decreased with a sequence shorter than 5 amino acids or longer than 15 amino-acids. Moreover the cytotoxicity of the peptides became proportionally more pronounced with increase in peptide length [45]. Ala scan studies demonstrate that all residues in the Tat sequence are necessary for their cellular uptake ability [46]. Overall, studies on the role of Arg residues showed that these residues were crucial for the CPP cellular uptake [46,47]. The minimum number of Arg residues necessary for oligoarginine internalization was determined by Wender et al. to be 9 [46]. This represents the best compromise between cellular internalization efficacy, low cytotoxicity and low cost of production.

Arg-rich CPPs have been shown to efficiently internalize while that was not the case for Lys-rich CPPs. Indeed replacement of Arg by Lys totally abolished the cellular internalization of CPPs [25,45,48]. Arg residues have thus been highlighted as “magic residues” since then [49,50]. More than the cationic character of the Arg, the type of chemical bond formed between the CPP and the

lipid membrane seems to be much more important. The positive charge of basic amino-acids is thus necessary but not sufficient for internalization of these peptides. Rothbard et al. showed that Lys residues only create monodentate interactions with the negative charges of the membrane while Arg residues form bidentate binding (Fig. 1B). Such interactions allow the formation of a negative Gaussian curvature of the membrane leading to membrane invagination (Fig. 1C) [51,52]. Besides the electrostatic interaction between Arg residues and lipid and GAGs in membranes, it has also been proposed the possibility that Arg residues form specific uptake-promoting interactions with receptor-like components on the cell surface [51–53].

### 4. CPPs as “tumor-homing peptides”?

CPPs have a great potential for therapeutic or imaging agents delivery, considering the fact that they are non-invasive and not toxic to cells. One of the major issues of existing drug delivery systems is the cell- or tissue-specific targeting that could improve their therapeutic efficiency and decrease secondary side effects associated. CPPs can bring the absent internalization property to most of these molecules but, until recently, lacked specificity in their targeting both in terms of the tissue, cell or intracellular organelle to be reached. One way to overcome that is to couple the CPP to peptides or proteins that interact with specific biomarkers present in certain cells or tissues (Table 1). In some cases a tri-conjugate can be synthesized and contains a targeting part (an antibody fragment or an antitumor specific recognition sequence), a cellular uptake component (a CPP) and a therapeutic or imaging agent [54,55]. One should note that the cargo that is coupled to the CPP can serve as the therapeutic drug as well as the targeting component of the conjugate. For example Penetratin and Tat have been coupled to many therapeutic molecules allowing to specifically address tumoral cells [56–60]. Tat peptide was coupled to antitumor antibody fragments which enhanced its cell membrane retention and cellular internalization in breast carcinoma cells [57]. In another example, the nonspecific cell-penetrating activity of penetratin was combined with the tumor targeting property of a single chain fragment antibody to directly target colon carcinoma xenograft-bearing mice [61]. It was recently shown that a proapoptotic peptide (KLA) coupled to penetratin by a disulfide bridge could specifically target tumor cell lines and induce cell death by mitochondria disruption [62]. Anticancer drugs specific of glioma cells were also coupled to the CPP pVec and showed efficient targeting and drug release of a well-known antitumor agent,



**Table 1**  
CPPs coupled to cargos allowing cell specific or tissue specific targeting.

CPP	Peptide sequence	Length	Cargo	Targeting components	Target tissue or cell	Ref.
Penetratin	RQIKIWFAQNRRMKWK	16	KLAK	scFv, KLa-Pen	Lung cancer, colon cancer, neuroblastoma, glioblastoma	[61,62]
Tat	YGRKKRRQRRR	11	Liposomes, Fab	Tat	Colon cancer, squamous carcinoma, breast cancer	[57,65]
IL-13p	TAMRAVDKLLHLKKLFREG QFNRRNFESIICRDRT	36	NP	IL-13p	Glioblastoma cells	[69]
R8, R9	RRRRRRRR(R)	8, 9	Doxorubicin	R8, Hepsin specific peptide (IPL)	Tumor xenografts	[55,64,70]
pVec	LLIILRRRIRKQAHASK	18	Doxorubicin	Glioma targeting sequence (gHo)	Glioma cell line	[63]

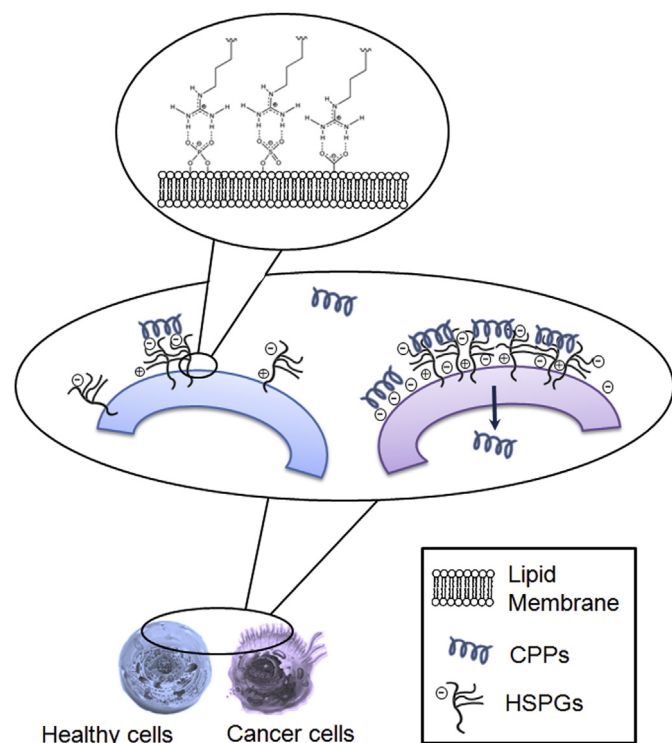
doxorubicin [63]. Certain CPPs, such as the R8, were also found to specifically accumulate in tumors [64]. Studies on Tat and penetratin conjugation with nanoparticle liposome carriers even showed that cellular internalization was proportional to the number of CPPs attached to the liposomes [65].

While a loss of cellular internalization efficacy was observed when some CPPs are coupled to a cargo whose role is a specific tumor cells targeting (monoclonal antibodies, receptor-specific peptides or proteins, nucleic acids, small molecules, and even vitamins or carbohydrates) [21], sometimes conjugation with this cargo increases their cellular uptake or alter the mode of internalization of the CPP [57,61,66–68].

CPPs are usually highly cationic which renders them particularly prone to interact with negatively charged membranes with high affinity [8,10,25,64]. Their internalization efficacy is strongly diminished when replacing Arg residues by other cationic compounds and also in absence of GAGs (cellular uptake studies on GAG-deficient cells) [69]. Among the CPPs already used for therapeutic actions, Tat peptide has proven to be highly internalized into

different cell lines although its activity is not specifically addressed to a particular cell line [56]. This lack of specificity for certain type of cells hampers CPP optimization for therapeutic efficiency. Nonetheless, recent biophysical and biological studies have shown that CPP affinity and binding to negatively charged model membranes is much more important than for zwitterionic ones [8,25,70]. Therefore, this property could be used to confer certain CPPs with selectivity toward certain cell types, for example tumoral cells that possess an enhanced anionic character (Fig. 2). Indeed recent studies on the interaction of the CPP RW16 with lipid membranes have shown a marked interaction and perturbation of anionic lipid membranes by this peptide compared to zwitterionic ones [8]. That could partially explain the specific effect of this CPP on tumor cell growth [71]. Similarly, for the conjugate KLA–penetratin (KLA being apoptotic), the interaction and perturbation of anionic lipid membranes by the conjugate was strong while that on zwitterionic membranes was negligible. This marked effect on anionic lipid membranes could explain, at least partially, the selectivity in terms of cell death observed for several tumor cell lines (including cell lines resistant to commonly used anticancer agents) without any toxicity toward healthy cell lines [62].

In 2012 Kondo et al. identified, by mRNA phage display technology, a series of CPPs capable of specifically binding tumor cell lines (Table 2) [72]. In general, the CPP sequences comport both hydrophobic and positively charged amino acids, a general property of many CPPs. They observed that each amino acid is important for the internalization process, the suppression of a single amino acid being deleterious for CPP cellular uptake. In this study, they show that the oligoarginine R9 is only able of internalizing into different cell lines without specificity while the series of new CPPs with tumor activity named “tumor-homing peptides” are able to be taken up specifically by cancer cells [72,73].



**Fig. 2.** CPP interactions with healthy and tumor cell membrane components in view of their potential as “tumor-homing peptides”.

**Table 2**  
Ten tumor-homing cell penetrating peptides identified by Kondo et al. Table adapted from Ref. [72].

CPPs	Amino acid sequence
Tat	YGRKKRPQRRR
2	DSLKSYWYLQKFSWR
7	KLWMRWWSPTTRRYG
10	RLWMRWYSPWTRRWG
28	RLIMRIYAPTTRRYG
30	RLYMRYYSPITRRYG
33	RLWMRWYSPRTRAYG
44	KRPTMRFRYTWNPMK
45	WKCRRCQFRVLHHWN
47	WKCRRCQAFRVLHHWN
48	WKARRCQFRVLHHWN

## 5. Conclusion

As described before, subtle structural differences often cause considerable differences in terms of cell internalization mechanisms, and cellular and tissue targeting of CPPs. The importance in electrostatic interactions between the CPPs and anionic partners in the cell membrane (GAGs and anionic lipids) could be advantageous and used to increase the selectivity in CPP targeting to tissues or cells with an enhanced anionic character such as the case of tumor cell lines. Therefore, research continues toward the development of vectors having already higher translocation efficiencies to provide them with some or further improve their selectivity for specific cells and tissues.

## Conflict of interest

None

## References

- [1] G.P. Dietz, M. Bahr, Delivery of bioactive molecules into the cell: the Trojan horse approach, *Mol. Cell. Neurosci.* 27 (2004) 85–131.
- [2] S. Deshayes, M.C. Morris, G. Divita, F. Heitz, Cell-penetrating peptides: tools for intracellular delivery of therapeutics, *Cell. Mol. Life Sci.* 62 (2005) 1839–1849.
- [3] E. Vives, Present and future of cell-penetrating peptide mediated delivery systems: “is the Trojan horse too wild to go only to Troy?”, *J. Control. Release* 109 (2005) 77–85.
- [4] E. Vives, P. Brodin, B. Lebleu, A truncated HIV-1 Tat protein basic domain rapidly translocates through the plasma membrane and accumulates in the cell nucleus, *J. Biol. Chem.* 272 (1997) 16010–16017.
- [5] M. Bernfield, M. Gotte, P.W. Park, O. Reizes, M.L. Fitzgerald, J. Lincecum, M. Zako, Functions of cell surface heparan sulfate proteoglycans, *Annu. Rev. Biochem.* 68 (1999) 729–777.
- [6] I.D. Alves, C.Y. Jiao, S. Aubry, B. Aussedat, F. Burlina, G. Chassaing, S. Sagan, Cell biology meets biophysics to unveil the different mechanisms of penetratin internalization in cells, *Biochim. Biophys. Acta* 1798 (2010) 2231–2239.
- [7] C. Bechara, S. Sagan, Cell-penetrating peptides: 20 years later, where do we stand? *FEBS Lett.* 587 (2013) 1693–1702.
- [8] M.L. Jobin, P. Bonnafous, H. Temsamani, F. Dole, A. Grelard, E.J. Dufourc, I.D. Alves, The enhanced membrane interaction and perturbation of a cell penetrating peptide in the presence of anionic lipids: toward an understanding of its selectivity for cancer cells, *Biochim. Biophys. Acta* 1828 (2013) 1457–1470.
- [9] P. Wadhvani, R.F. Epan, N. Heidenreich, J. Burck, A.S. Ulrich, R.M. Epan, Membrane-active peptides and the clustering of anionic lipids, *Biophys. J.* 103 (2012) 265–274.
- [10] A. Ziegler, J. Seelig, Contributions of glycosaminoglycan binding and clustering to the biological uptake of the nonamphipathic cell-penetrating peptide WR9, *Biochemistry* 50 (2011) 4650–4664.
- [11] I.R. de Figueiredo, J.M. Freire, L. Flores, A.S. Veiga, M.A. Castanho, Cell-penetrating peptides: a tool for effective delivery in gene-targeted therapies, *IUBMB Life* 66 (3) (2014) 182–194.
- [12] X. Lin, N. Perrimon, Role of heparan sulfate proteoglycans in cell-cell signaling in *Drosophila*, *Matrix Biol.* 19 (2000) 303–307.
- [13] F.H. Blackhall, C.L. Merry, E.J. Davies, G.C. Jayson, Heparan sulfate proteoglycans and cancer, *Br. J. Cancer* 85 (2001) 1094–1098.
- [14] E.H. Knelson, J.C. Nee, G.C. Blobe, Heparan sulfate signaling in cancer, *Trends Biochem. Sci.* 39 (6) (2014) 277–288.
- [15] D. Derossi, S. Calvet, A. Trembleau, A. Brunissen, G. Chassaing, A. Prochiantz, Cell internalization of the third helix of the Antennapedia homeodomain is receptor-independent, *J. Biol. Chem.* 271 (1996) 18188–18193.
- [16] F. Duchardt, M. Fotin-Mleczek, H. Schwarz, R. Fischer, R. Brock, A comprehensive model for the cellular uptake of cationic cell-penetrating peptides, *Traffic* 8 (2007) 848–866.
- [17] S. El Andaloussi, P. Guterstam, U. Langel, Assessing the delivery efficacy and internalization route of cell-penetrating peptides, *Nat. Protoc.* 2 (2007) 2043–2047.
- [18] H. Binder, G. Lindblom, Charge-dependent translocation of the Trojan peptide penetratin across lipid membranes, *Biophys. J.* 85 (2003) 982–995.
- [19] C.Y. Jiao, D. Delaroche, F. Burlina, I.D. Alves, G. Chassaing, S. Sagan, Translocation and endocytosis for cell-penetrating peptide internalization, *J. Biol. Chem.* 284 (2009) 33957–33965.
- [20] I.D. Alves, A. Walrant, C. Bechara, S. Sagan, Is there anybody in there? On the mechanisms of wall crossing of cell penetrating peptides, *Curr. Protein Pept. Sci.* 13 (2012) 658–671.
- [21] E. Vives, Cellular uptake [correction of utake] of the Tat peptide: an endocytosis mechanism following ionic interactions, *J. Mol. Recognit.* 16 (2003) 265–271.
- [22] H.J. Ryser, R. Hancock, Histones and basic polyamino acids stimulate the uptake of albumin by tumor cells in culture, *Science* 150 (1965) 501–503.
- [23] M. Belting, Heparan sulfate proteoglycan as a plasma membrane carrier, *Trends Biochem. Sci.* 28 (2003) 145–151.
- [24] I. Nakase, A. Tadokoro, N. Kawabata, T. Takeuchi, H. Katoh, K. Hiramoto, M. Negishi, M. Nomizu, Y. Sugiura, S. Futaki, Interaction of arginine-rich peptides with membrane-associated proteoglycans is crucial for induction of actin organization and macropinocytosis, *Biochemistry* 46 (2007) 492–501.
- [25] A. Walrant, I. Correia, C.Y. Jiao, O. Lequin, E.H. Bent, N. Goasdoue, C. Lacombe, G. Chassaing, S. Sagan, I.D. Alves, Different membrane behaviour and cellular uptake of three basic arginine-rich peptides, *Biochim. Biophys. Acta* 1808 (2011) 382–393.
- [26] P. Lecorche, A. Walrant, F. Burlina, L. Dutot, S. Sagan, J.M. Mallet, B. Desbat, G. Chassaing, I.D. Alves, S. Lavielle, Cellular uptake and biophysical properties of galactose and/or tryptophan containing cell-penetrating peptides, *Biochim. Biophys. Acta* 1818 (2012) 448–457.
- [27] N. Afratis, C. Gialeli, D. Nikitovic, T. Tsegienidis, E. Karousou, A.D. Theocharis, M.S. Pavao, G.N. Tzanakakis, N.K. Karamanos, Glycosaminoglycans: key players in cancer cell biology and treatment, *FEBS J.* 279 (2012) 1177–1197.
- [28] K. Matsuda, H. Maruyama, F. Guo, J. Kleff, J. Itakura, Y. Matsumoto, A.D. Lander, M. Korc, Glypican-1 is overexpressed in human breast cancer and modulates the mitogenic effects of multiple heparin-binding growth factors in breast cancer cells, *Cancer Res.* 61 (2001) 5562–5569.
- [29] D. Nikitovic, M. Mytilinaiou, A. Berdiaki, N.K. Karamanos, G.N. Tzanakakis, Heparan sulfate proteoglycans and heparin regulate melanoma cell functions, *Biochim. Biophys. Acta* 1840 (8) (2014) 2471–2481.
- [30] G. Chalkiadaki, D. Nikitovic, A. Berdiaki, M. Sifaki, K. Krasagakis, P. Katonis, N.K. Karamanos, G.N. Tzanakakis, Fibroblast growth factor-2 modulates melanoma adhesion and migration through a syndecan-4-dependent mechanism, *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 41 (2009) 1323–1331.
- [31] S.I. Zittermann, M.I. Capurro, W. Shi, J. Filmus, Soluble glypican 3 inhibits the growth of hepatocellular carcinoma in vitro and in vivo, *Int. J. Cancer* 126 (2010) 1291–1301.
- [32] J.H. Lee, H. Park, H. Chung, S. Choi, Y. Kim, H. Yoo, T.Y. Kim, H.J. Hann, I. Seong, J. Kim, K.G. Kang, I.O. Han, E.S. Oh, Syndecan-2 regulates the migratory potential of melanoma cells, *J. Biol. Chem.* 284 (2009) 27167–27175.
- [33] R.D. Sanderson, Heparan sulfate proteoglycans in invasion and metastasis, *Semin. Cell Dev. Biol.* 12 (2001) 89–98.
- [34] I. Vlodavsky, O. Goldshmidt, E. Zcharia, R. Atzmon, Z. Rangini-Guatta, M. Elkin, T. Peretz, Y. Friedmann, Mammalian heparanase: involvement in cancer metastasis, angiogenesis and normal development, *Semin. Cancer Biol.* 12 (2002) 121–129.
- [35] C. Bechara, M. Pallerla, Y. Zaltsman, F. Burlina, I.D. Alves, O. Lequin, S. Sagan, Tryptophan within basic peptide sequences triggers glycosaminoglycan-dependent endocytosis, *FASEB J.* 27 (2013) 738–749.
- [36] S. Deshayes, T. Plenat, G. Aldrian-Herrada, G. Divita, C. Le Grimmelc, F. Heitz, Primary amphipathic cell-penetrating peptides: structural requirements and interactions with model membranes, *Biochemistry* 43 (2004) 7698–7706.
- [37] A. Walrant, A. Vogel, I. Correia, O. Lequin, B.E. Olausson, B. Desbat, S. Sagan, I.D. Alves, Membrane interactions of two arginine-rich peptides with different cell internalization capacities, *Biochim. Biophys. Acta* 1818 (2012) 1755–1763.
- [38] A.B. Hendrich, K. Michalak, Lipids as a target for drugs modulating multidrug resistance of cancer cells, *Curr. Drug Targets* 4 (2003) 23–30.
- [39] B. Frey, U.S. Gaip, The immune functions of phosphatidylserine in membranes of dying cells and microvesicles, *Semin. Immunopathol.* 33 (2011) 497–516.
- [40] S. Ran, A. Downes, P.E. Thorpe, Increased exposure of anionic phospholipids on the surface of tumor blood vessels, *Cancer Res.* 62 (2002) 6132–6140.
- [41] J. Connor, C. Bucana, I.J. Fidler, A.J. Schroit, Differentiation-dependent expression of phosphatidylserine in mammalian plasma membranes: quantitative assessment of outer-leaflet lipid by prothrombinase complex formation, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 86 (1989) 3184–3188.
- [42] T. Utsugi, A.J. Schroit, J. Connor, C.D. Bucana, I.J. Fidler, Elevated expression of phosphatidylserine in the outer membrane leaflet of human tumor cells and recognition by activated human blood monocytes, *Cancer Res.* 51 (1991) 3062–3066.
- [43] M. Sok, M. Sentjurs, M. Schara, Membrane fluidity characteristics of human lung cancer, *Cancer Lett.* 139 (1999) 215–220.
- [44] S. Futaki, T. Suzuki, W. Ohashi, T. Yagami, S. Tanaka, K. Ueda, Y. Sugiura, Arginine-rich peptides. An abundant source of membrane-permeable peptides having potential as carriers for intracellular protein delivery, *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 5836–5840.
- [45] D.J. Mitchell, D.T. Kim, L. Steinman, C.G. Fathman, J.B. Rothbard, Polyarginine enters cells more efficiently than other polycationic homopolymers, *J. Pept. Res.* 56 (2000) 318–325.
- [46] P.A. Wender, D.J. Mitchell, K. Pattabiraman, E.T. Pelkey, L. Steinman, J.B. Rothbard, The design, synthesis, and evaluation of molecules that enable or enhance cellular uptake: peptidic molecular transporters, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97 (2000) 13003–13008.
- [47] P.M. Fischer, N.Z. Zhelev, S. Wang, J.E. Melville, R. Fahraeus, D.P. Lane, Structure–activity relationship of truncated and substituted analogues of the intracellular delivery vector Penetratin, *J. Pept. Res.* 55 (2000) 163–172.

- [48] H.L. Amand, H.A. Rydberg, L.H. Fornander, P. Lincoln, B. Norden, E.K. Esbjörner, Cell surface binding and uptake of arginine- and lysine-rich penetratin peptides in absence and presence of proteoglycans, *Biochim. Biophys. Acta* 1818 (2012) 2669–2678.
- [49] M. Nishihara, F. Perret, T. Takeuchi, S. Futaki, A.N. Lazar, A.W. Coleman, N. Sakai, S. Matile, Arginine magic with new counterions up the sleeve, *Org. Biomol. Chem.* 3 (2005) 1659–1669.
- [50] N. Sakai, T. Takeuchi, S. Futaki, S. Matile, Direct observation of anion-mediated translocation of fluorescent oligoarginine carriers into and across bulk liquid and anionic bilayer membranes, *ChemBiochem* 6 (2005) 114–122.
- [51] A. Mishra, V.D. Gordon, L. Yang, R. Coridan, G.C. Wong, HIV TAT forms pores in membranes by inducing saddle-splay curvature: potential role of bidentate hydrogen bonding, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 47 (2008) 2986–2989.
- [52] J.B. Rothbard, T.C. Jessop, P.A. Wender, Adaptive translocation: the role of hydrogen bonding and membrane potential in the uptake of guanidinium-rich transporters into cells, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 57 (2005) 495–504.
- [53] J.M. Gump, R.K. June, S.F. Dowdy, Revised role of glycosaminoglycans in TAT protein transduction domain-mediated cellular transduction, *J. Biol. Chem.* 285 (2010) 1500–1507.
- [54] M. Hyvonen, J. Enback, T. Huhtala, J. Lammi, H. Sihto, J. Weisell, H. Joensuu, K. Rosenthal-Aizman, S. El-Andaloussi, U. Langel, A. Narvanen, G. Bergers, P. Laakkonen, Novel target for peptide-based imaging and treatment of brain tumors, *Mol. Cancer Ther.* 13 (2014) 996–1007.
- [55] M.H. Kang, M.J. Park, H.J. Yoo, K.Y. Hyuk, S.G. Lee, S.R. Kim, D.W. Yeom, M.J. Kang, Y.W. Choi, RIPL peptide (IPLVPLRRRRRRRC)-conjugated liposomes for enhanced intracellular drug delivery to hepsin-expressing cancer cells, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 87 (3) (2014) 489–499.
- [56] V.P. Torchilin, Tat peptide-mediated intracellular delivery of pharmaceutical nanocarriers, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 60 (2008) 548–558.
- [57] D.C. Anderson, E. Nichols, R. Manger, D. Woodle, M. Barry, A.R. Fritzberg, Tumor cell retention of antibody Fab fragments is enhanced by an attached HIV TAT protein-derived peptide, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 194 (1993) 876–884.
- [58] M.M. Fretz, G.A. Koning, E. Mastrobattista, W. Jiskoot, G. Storm, OVCAR-3 cells internalize TAT-peptide modified liposomes by endocytosis, *Biochim. Biophys. Acta* 1665 (2004) 48–56.
- [59] C. Marty, C. Meylan, H. Schott, K. Ballmer-Hofer, R.A. Schwendener, Enhanced heparan sulfate proteoglycan-mediated uptake of cell-penetrating peptide-modified liposomes, *Cell. Mol. Life Sci.* 61 (2004) 1785–1794.
- [60] S. Wang, N.Z. Zhelev, S. Duff, P.M. Fischer, Synthesis and biological activity of conjugates between paclitaxel and the cell delivery vector penetratin, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 16 (2006) 2628–2631.
- [61] M. Jain, S.C. Chauhan, A.P. Singh, G. Venkatraman, D. Colcher, S.K. Batra, Penetratin improves tumor retention of single-chain antibodies: a novel step toward optimization of radioimmunotherapy of solid tumors, *Cancer Res.* 65 (2005) 7840–7846.
- [62] I.D. Alves, M. Carre, M.P. Montero, S. Castano, S. Lecomte, R. Marquant, P. Lecorche, F. Burlina, C. Schatz, S. Sagan, G. Chassaing, D. Braguer, S. Lavielle, A proapoptotic peptide conjugated to penetratin selectively inhibits tumor cell growth, *Biochim. Biophys. Acta* 1838 (2014) 2087–2098.
- [63] E. Eriste, K. Kurrikoff, J. Suhorutskov, N. Oskolkov, D.M. Copolovici, S. Jones, P. Laakkonen, J. Howl, U. Langel, Peptide-based glioma-targeted drug delivery vector gHoPe2, *Bioconjug. Chem.* 24 (2013) 305–313.
- [64] I. Nakase, Y. Konishi, M. Ueda, H. Saji, S. Futaki, Accumulation of arginine-rich cell-penetrating peptides in tumors and the potential for anticancer drug delivery in vivo, *J. Control. Release* 159 (2012) 181–188.
- [65] Y.L. Tseng, J.J. Liu, R.L. Hong, Translocation of liposomes into cancer cells by cell-penetrating peptides penetratin and tat: a kinetic and efficacy study, *Mol. Pharmacol.* 62 (2002) 864–872.
- [66] E. Koren, A. Apte, A. Jani, V.P. Torchilin, Multifunctional PEGylated 2C5-immunoliposomes containing pH-sensitive bonds and TAT peptide for enhanced tumor cell internalization and cytotoxicity, *J. Control. Release* 160 (2012) 264–273.
- [67] G. Tunnemann, R.M. Martin, S. Haupt, C. Patsch, F. Edenhofer, M.C. Cardoso, Cargo-dependent mode of uptake and bioavailability of TAT-containing proteins and peptides in living cells, *FASEB J.* 20 (2006) 1775–1784.
- [68] J.R. Maiolo, M. Ferrer, E.A. Ottinger, Effects of cargo molecules on the cellular uptake of arginine-rich cell-penetrating peptides, *Biochim. Biophys. Acta* 1712 (2005) 161–172.
- [69] M.E. Favretto, R. Wallbrecher, S. Schmidt, R. van de Putte, R. Brock, Glycosaminoglycans in the cellular uptake of drug delivery vectors – bystanders or active players? *J. Control. Release* 180 (2014) 81–90.
- [70] A. Ziegler, J. Seelig, Binding and clustering of glycosaminoglycans: a common property of mono- and multivalent cell-penetrating compounds, *Biophys. J.* 94 (2008) 2142–2149.
- [71] D. Delaroche, F.X. Cantrelle, F. Subra, C. Van Heijenoort, E. Guittet, C.Y. Jiao, L. Blanchoin, G. Chassaing, S. Lavielle, C. Auclair, S. Sagan, Cell-penetrating peptides with intracellular actin-remodeling activity in malignant fibroblasts, *J. Biol. Chem.* 285 (2010) 7712–7721.
- [72] E. Kondo, K. Saito, Y. Tashiro, K. Kamide, S. Uno, T. Furuya, M. Mashita, K. Nakajima, T. Tsumuraya, N. Kobayashi, M. Nishibori, M. Tanimoto, M. Matsushita, Tumour lineage-homing cell-penetrating peptides as anti-cancer molecular delivery systems, *Nat. Commun.* 3 (2012) 951.
- [73] S. Richter, V. Bouvet, M. Wuest, R. Bergmann, J. Steinbach, J. Pietzsch, I. Neundorff, F. Wuest, (18)F-Labeled phosphopeptide-cell-penetrating peptide dimers with enhanced cell uptake properties in human cancer cells, *Nucl. Med. Biol.* 39 (2012) 1202–1212.
- [74] A. Mishra, G.H. Lai, N.W. Schmidt, V.Z. Sun, A.R. Rodriguez, R. Tong, L. Tang, J. Cheng, T.J. Deming, D.T. Kamei, G.C. Wong, Translocation of HIV TAT peptide and analogues induced by multiplexed membrane and cytoskeletal interactions, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108 (2011) 16883–16888.

# **The role of tryptophans on the cellular uptake and membrane interaction of arginine-rich cell penetrating peptides**

Marie-Lise Jobin<sup>1</sup>, Marine Blanchet<sup>1</sup>, Sarah Henry<sup>1</sup>, Stéphane Chaignepain<sup>1</sup>, Claude Manigand<sup>1</sup>, Sabine Castano<sup>1</sup>, Sophie Lecomte<sup>1</sup>, Fabienne Burlina<sup>2</sup>, Sandrine Sagan<sup>2</sup>, Isabel D. Alves<sup>1</sup>

<sup>1</sup> *CBMN-Univ Bordeaux, UMR 5248, Allée Geoffroy St Hilaire, 33600 Pessac*

<sup>2</sup> *Sorbonne Universités - UPMC Univ Paris 06, École Normale Supérieure-PSL Research University, Département de Chimie, CNRS UMR 7203 LBM, 4 Place Jussieu, F-75005, Paris, France*

**Keywords:** cell penetrating peptide, peptide/lipid interaction, lipid model systems.

**Abbreviations:** AMP, Anti-microbial Peptide; ATR-FTIR, Attenuated Total Reflectance – Fourier Transform Infrared; CPP, Cell-penetrating Peptide; CD, Circular dichroism; CHO, Chinese hamster ovary; DOPC, Dioleoylphosphatidylcholine DOPG, Dioleoylphosphatidylglycerol; DLS, Dynamic light scattering; GAG, Glycosaminoglycan; HSPG, Heparan sulfate protéoglycans; LUV, Large unilamellar vesicle; MALDI, Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization; MLV, Multi lamellar vesicle; MS, Mass spectrometry; PC, Phosphatidylcholine; PG, Phosphatidylglycerol; PWR, Plasmon Waveguide Resonance; SAR, Structure/Activity Relationship; SUV, Small Unilamellar Vesicles.

## **Abstract**

Cell-penetrating peptides (CPP) are able to efficiently transport cargos across cell membranes without being cytotoxic to cells, thus present a great potential in drug delivery and diagnosis. While the role of cationic residues in CPPs has been well studied, that of Trp is still not clear. Herein 7 peptide analogs of RW9 (RRWWRRWRR, an efficient CPP) were synthesized in which Trp were systematically replaced by Phe residues. Quantification of cellular uptake reveals that substitution of Trp by Phe strongly reduces the internalization of all peptides despite the fact that they strongly accumulate in the cell membrane. Cellular internalization and biophysical studies show that not only the number of Trp residues but also their positioning in the helix and the size of the hydrophobic face they form are important for their internalization efficacy, the highest uptake occurring for the analog with 3 Trp residues. Using CD and ATR-FTIR spectroscopy we observe that all peptides became structured in contact with lipids, mainly in  $\alpha$ -helix. Intrinsic tryptophan fluorescence studies indicate that all peptides partition in the membrane in about the same manner ( $K_p \sim 10^5$ ) and that they are located just below the lipid headgroups ( $\sim 10$  Å) with slightly different insertion depths for the different analogs. Plasmon waveguide resonance studies reveal a direct correlation between the number of Trp residues and the reversibility of the interaction following membrane washing. Thus a more interfacial location of the CPP renders the interaction with the membrane more adjustable and transitory enhancing its internalization ability.

## **Introduction**

One of the major obstacles to the use of large therapeutic molecules or imaging agents having intracellular targets is their low permeability through biomembranes. One of the breakthroughs of the last 20 years is the discovery of cell-penetrating peptides (CPP) as molecules capable of internalizing into cells in a receptor- and energy-independent way and without being toxic to cells. Their great potential relies on the fact that they can transport a great variety of cargoes into cells both in terms of size and nature and some CPPs are even already used as drug delivery vector (for a review, see [1]). Green & Loewenstein and Frankel & Pabo discovered the first CPP almost simultaneously in 1988 [2, 3]. They found that the Tat protein from HIV-1 was internalized into cells and Vivès *et al.*, found in 1997 the minimal sequence that was responsible for the protein internalization [4]. Following this finding, penetratin was discovered in 1994 by the group of Alain Prochiantz [5]. This is a peptide derived from the homeodomain of the *Drosophila* homeobox *Antennapedia* and was shown to possess a good internalization efficacy. Since then a large number of structure/activity relationship studies have been performed both to study their membrane-translocating capabilities and to design novel sequences with greater efficacy and better selectivity.

Since the Tat peptide possesses a large number of basic residues (6 Arg and 2 Lys on 13 residues) Wender and Rothbard discovered that a polyarginine comprising 9 residues is an efficient CPP [6]. Futaki group then synthesized oligoarginines of different lengths ( $R_n$  with  $6 < n < 12$ ) and studied their internalization efficiency [7]. They could determine that 8 Arg residues were sufficient to confer the polyarginine cell penetrating properties. Different derivatives of penetratin have also been synthesized and it was observed that the internalization was based neither on the chirality of the peptide, nor its amphiphilicity or its secondary structure [5, 8]. Regarding the mechanisms implicated in their cellular internalization, it has been generally accepted that both endocytosis and direct translocation through the membrane are implicated in their uptake. The balance between the two mechanisms depends on a great variety of aspects such as the nature and size of the CPP and its cargo, the nature of the link between the two, the temperature at which internalization experiments are conducted, the cell lines used, among others parameters [9-12]. Electrostatic interactions between the positive charges in the peptide and negative charges in the cell membrane surface have been shown to be essential during the first stage of interaction with the membrane. The presence of basic amino acids in the sequence has been well studied and Arg residues have been reported to be especially important for cellular internalization. It was shown that the uptake efficiency is attributed to the type of bond formed between Arg and the lipid headgroups rather than the charges presented to the membrane. Indeed Arg can form bidentate hydrogen bonds that interact simultaneously with phosphate moieties on multiple lipid headgroups while Lys residues can only form monodentate hydrogen bonds that interact with the phosphate moiety on a single headgroup [13, 14]. Guanidinium-rich peptides also establish strong electrostatic interactions with negatively charged heparan sulfate proteoglycans (HSPG) on the cell surface, important as a first recognition and their accumulation in the membrane [15, 16]. The presence of hydrophobic residues for internalization has also been investigated. The substitution of the Trp<sup>48</sup> and Trp<sup>56</sup> by Phe abolished totally the internalization of penetratin [17]. From these studies, the Arg-rich CPP RW9 (RRWWRRWRR) was designed and determined to possess very high cellular uptake efficiency [18]. Biological studies on RW9 have revealed an important decrease in internalization in GAG-deficient cells evidencing that proteoglycans at the membrane surface are important for its cellular internalization [19]. Biophysical studies have shown its preferential interaction with anionic model membranes corroborating biological studies on the importance of electrostatic interactions between peptide and membranes. Previous studies on RL9 (RLLRRLRR), an analog of RW9 where Trp residues were replaced by Leu residues have shown that this peptide was not internalized into cells despite the fact that it accumulated in the membrane [19, 20]. At the same time, oligoarginine peptide ( $R_9$ ) possessing no aromatic residues internalizes very well in eukaryotic cells at approximately the same level as RW9 [19]. The main question addressed here is to understand the role of the Trp in membrane translocation regarding the RW9 sequence. Therefore, we synthesized 7 peptides in

which Phe systematically replaced Trp residues (RX9) (Table 1). The strategy was to keep the hydrophobicity but specially the aromaticity of the hydrophobic residues, because previous NMR studies on RW9 evidenced the existence of  $\pi$ -cation interactions between certain Arg and Trp residues [19].

Quantification of the total amount of internalized peptide (all intracellular compartments included) peptides shows that the replacement of all Trp residues almost completely abolished the peptide internalization while the substitution of 1 or 2 Trp strongly decreases their internalization efficiency. To understand these differences in cellular internalization we have decided to investigate the interaction of these peptides with lipid membranes and therefore shed some light into their membrane crossing and translocation. It should be noted that direct translocation through the cell membrane is just one of the many mechanisms used by CPPs to internalize, nonetheless a good understanding of CPP interaction with lipids is important. For that we have used lipid model systems and different biophysical approaches in an attempt to correlate their cellular uptake and membrane direct translocation with bilayer interaction. Since electrostatic interactions were found to be important for the membrane interaction of Arg-rich peptides with cellular membranes [see [21] for a review] we have included anionic lipids in the model membranes used. Even though anionic lipids are very weakly present in eukaryotic cell membrane, especially in the outer leaflet, the few anionic lipids present (~ 2%) can have their potential enhanced by assembling into domains, a property reported to be induced by certain CPPs [22]. Although, the outer leaflet of healthy eukaryotic membranes possess almost no anionic lipids, important electrostatic interactions between the CPPs and GAG can be established. Often biophysicists have employed anionic lipids just to mimic the overall anionic character of the cell membrane surface, which is also our approach here. Additionally it should be noted that during certain cellular dysfunctions such as when cells become tumoral or enter apoptosis, the amount of anionic lipids in their outer leaflet (mostly phosphatidylserine) increase up to 9%, rendering the cellular membrane significantly more anionic [23-26]. CD and ATR-FTIR were used to investigate the secondary structure of the peptides in contact with model membranes to define if there was a correlation between their tendency to adopt a secondary structure in the presence of lipids and their internalization capacities. No direct correlation was found. Their cytotoxicity on cells and effect on model membranes were explored. The replacement of Trp by Phe induced no cytotoxicity or dye leakage although the peptides bind and slightly perturb the membrane. The affinity and insertion depth of the peptides were studied by plasmon waveguide resonance and Trp fluorescence and a correlation with their internalization capacities was established.



	Peptide sequence	MW (Da)	Charges (at pH 7)
<b>RW9</b>	Biotin(O <sub>2</sub> )-GGGG-RRWWRRWRR-NH <sub>2</sub>	1999	6
<b>RFFF9</b>	Biotin(O <sub>2</sub> )-GGGG -RRFFRRFRR-NH <sub>2</sub>	1882	6
<b>RFFW9</b>	Biotin(O <sub>2</sub> )-GGGG -RRFFRRWRR-NH <sub>2</sub>	1921	6
<b>RWFF9</b>	Biotin(O <sub>2</sub> )-GGGG -RRWFRRFRR-NH <sub>2</sub>	1921	6
<b>RFWF9</b>	Biotin(O <sub>2</sub> )-GGGG -RRFWRRFRR-NH <sub>2</sub>	1921	6
<b>RFWW9</b>	Biotin(O <sub>2</sub> )-GGGG -RRFWRRWRR-NH <sub>2</sub>	1960	6
<b>RWWF9</b>	Biotin(O <sub>2</sub> )-GGGG -RRWWRRFRR-NH <sub>2</sub>	1960	6
<b>RWFW9</b>	Biotin(O <sub>2</sub> )-GGGG -RRWFRRWRR-NH <sub>2</sub>	1960	6

**Table 1.** Amino-acid sequences of the RX9 peptides used in this study.

## 1. Materials & Methods

### 1.1. Materials

All lipids were obtained from Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL, USA). The calcein and acrylamide were obtained from Sigma Aldrich. Biotin(O<sub>2</sub>)-([<sup>1</sup>H]-G)<sub>4</sub>-RRFFRRFRR-NH<sub>2</sub>(RF<sub>9</sub>), Biotin(O<sub>2</sub>)-([<sup>1</sup>H]-G)<sub>4</sub>-RRFFRRWRR-NH<sub>2</sub>(RFFW<sub>9</sub>), Biotin(O<sub>2</sub>)-([<sup>1</sup>H]-G)<sub>4</sub>-RRWFRRFRR-NH<sub>2</sub>(RWFF<sub>9</sub>), Biotin(O<sub>2</sub>)-([<sup>1</sup>H]-G)<sub>4</sub>-RRFWRRFRR-NH<sub>2</sub> (RFWF<sub>9</sub>), Biotin(O<sub>2</sub>)-([<sup>1</sup>H]-G)<sub>4</sub>-RRFWRRWRR-NH<sub>2</sub> (RFWW<sub>9</sub>), Biotin(O<sub>2</sub>)-([<sup>1</sup>H]-G)<sub>4</sub>-RRWWRRFRR-NH<sub>2</sub>(RWWF<sub>9</sub>), Biotin(O<sub>2</sub>)-([<sup>1</sup>H]-G)<sub>4</sub>-RRWFRRWRR-NH<sub>2</sub>(RWF<sub>9</sub>) and Biotin(O<sub>2</sub>)-([<sup>2</sup>H]-G)<sub>4</sub>-RRFFRRFRR-NH<sub>2</sub>, Biotin(O<sub>2</sub>)-([<sup>2</sup>H]-G)<sub>4</sub>-RRFFRRWRR-NH<sub>2</sub>, Biotin(O<sub>2</sub>)-([<sup>2</sup>H]-G)<sub>4</sub>-RRWFRRFRR-NH<sub>2</sub>, Biotin(O<sub>2</sub>)-([<sup>2</sup>H]-G)<sub>4</sub>-RRFWRRFRR-NH<sub>2</sub>, Biotin(O<sub>2</sub>)-([<sup>2</sup>H]-G)<sub>4</sub>-RRFWRRWRR-NH<sub>2</sub>, Biotin(O<sub>2</sub>)-([<sup>2</sup>H]-G)<sub>4</sub>-RRWWRRFRR-NH<sub>2</sub>, Biotin(O<sub>2</sub>)-([<sup>2</sup>H]-G)<sub>4</sub>-RRWFRRWRR-NH<sub>2</sub> were synthesized using the Fmoc solid-phase strategy ([<sup>1</sup>H]-G and [<sup>2</sup>H]-G correspond to non deuterated and bi-deuterated glycine, respectively). The oxidation protocol of the biotin was as follow. 10g of biotin were dissolved in 40mL of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (30% in H<sub>2</sub>O) and 120 mL of AcOH were added. The mixture was stirred at room temperature for few hours and a precipitate was formed. The precipitate was filtered, washed with Et<sub>2</sub>O and dried under vacuum. Oxidation efficiency of the biotin was checked by liquid-state NMR. Biotin sulfone was coupled to the peptide under the same conditions used for the amino-acids coupling. Peptides were purified by High Performance Liquid Chromatography (HPLC), in a reverse phase column (RP) C18 using H<sub>2</sub>O/CH<sub>3</sub>CN/TFA gradient. MALDI-TOF mass spectrometry was used to characterize the peptides. To efficiently remove the TFA counter-ion a simple method was used that consists in lyophilizing the sample 3 times in the presence of 10 mM HCl directly replacing TFA counter-ions with chloride ions [27]. A low concentration of HCl was used to prevent peptide degradation. The removal of TFA was followed by <sup>19</sup>F-NMR.



## **1.2. Cell culture**

Wild type Chinese Hamster Ovary CHO-K1 cells (WT) cells were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 10% fetal calf serum (FCS), penicillin(100,000 IU/L), streptomycin (100,000 IU/L), and amphotericin B (1 mg/L) in a humidified atmosphere containing 5% CO<sub>2</sub> at 37°C.

## **1.3. Cell viability assays**

Cell viability was measured using the Dojindo Cell-Counting Kit 8 based on the reduction of a reagent into a colored product by viable cell dehydrogenases. CHO-K1 cells were seeded in a 96-well plate 1 day before treatment (4000 cells per well). Cells were treated with 5 µM, 10 µM, 20 µM or 50 µM peptide for 1 h, 6h and 24h. Untreated cells were defined as living cells control (negative control) and 0.3% Triton X-100 as maximum cytotoxicity (positive control).

## **1.4. Cellular uptake and quantification of membrane-bound peptide**

Cellular uptake was quantified using the method described by Burlina *et al.* [28]. In this protocol, the studied peptides bear a tag composed of four glycine residues together with a biotin moiety for purification purposes. After 1 h incubation of 10 µM peptide and washing, a protease is added (0.05% Pronase in Tris-HCl buffer, 100 mM pH 7.5) in order to detach the cells and to degrade all the non-internalized or membrane-bound peptide. This avoids overestimating the quantity of internalized peptide due to the presence of peptides attached to the outer leaflet of the membrane. The cells are then lysed (0.3% Triton, 1 M NaCl) and boiled and the cell lysate is incubated with streptavidin-coated magnetic beads to extract the peptide from the lysate. This protocol gives access to the total amount of intact internalized peptide. For quantification of total cell-associated CPP (non washable membrane-bound + internalized peptide), the same experimental conditions were used except that no protease was added and the cells were directly lysed. The peptides are eluted from the streptavidin-coated magnetic beads with HCCA matrix and spotted on the MALDI plate. Mass spectrometry is not a quantitative method *per se*, therefore an internal standard is added to the lysis solution. This standard peptide has the same sequence as the one to quantify except that it bears a tag composed of four bi-deuterated glycine residues instead of four glycine residues. This allows the quantification of internalized and membrane-bound peptide. The samples were analyzed by MALDI-TOF MS (positive ion reflector mode) on a Voyager DEPRO mass spectrometer (Applied Biosystems).

### **1.5. Preparation of liposomes**

All liposomes were prepared by initially dissolving the appropriate amount of phospholipids, to obtain the desired concentration, in chloroform and methanol to ensure the complete mixing of the components. A lipid film was then formed by removing the solvent using a stream of N<sub>2</sub> (g) followed by 3h under vacuum. To form MLVs the dried lipids were dispersed in buffer (either 10 mM Tris, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA or 10 mM phosphate buffer depending on the technique used) and thorough vortexed. To form LUVs the MLV dispersion was run through five freeze/thawing cycles and passed through a mini-extruder equipped with two stacked 0.1 µm polycarbonate filters (Avanti, Alabaster, AL). SUVs were prepared by tip sonication after direct hydration of the lipid film.

### **1.6. Dynamic Light Scattering experiments**

The experiments were performed using the Zetasizer Nano (Malvern) system with an ALV Laser goniometer, which consisted of a 35 mW HeNe linear polarized laser with a wavelength of 632.8 nm and an ALV-5000/EPP Multiple Tau Digital correlator with 125 ns initial sampling time. The measurements were carried out at 173°. All measurements were performed at room temperature (25°C) in phosphate buffer. To get an insight into the influence of the peptides on LUVs integrity, 40 µL of a 1mg/mL LUV solution was analyzed by DLS, followed by addition of a small volume of peptide (1 mM) to the LUV suspension to the desired P/L ratio (1/100, 1/50, 1/25, 1/10) and particle size again analyzed, immediately.

### **1.7. Circular dichroism experiments**

CD data were recorded on a Jasco J-815 CD spectrophotometer with a 1 mm path length. Far-UV spectra were recorded from 180 to 270 nm with a 0.5 nm step resolution and a 2 nm bandwidth at 37°C. The scan speed was 50 nm/min (0.5 s response time), and the spectra were averaged over 8 scans. CD spectra were collected for all the peptides in phosphate buffer with and without liposomes at different P/L ratio (1/50, 1/25, 1/10). For each sample, the background (buffer) was automatically subtracted from the signal. Spectra were smoothed using a Savitzky-Golay smoothing filter. Spectra were deconvoluted using the software CDFriend previously developed in our laboratory (S. Buchoux, not published).

### **1.8. ATR-FTIR spectroscopy**

Small unilamellar vesicles (SUV) composed of DOPC or DOPC:DOPG (4:1) were prepared in a solution of D<sub>2</sub>O. SUVs were burst on a germanium ATR crystal to form a single bilayer which is controlled by the measurement of the absolute IR intensity. ATR spectra were recorded on a Nicolet 6700 spectrometer ThermoScientific equipped with a MCT detector cooled at 77 K. Since ATR spectroscopy is sensitive to the orientation of the structures, spectra were recorded with parallel (*p*) and perpendicular (*s*) polarizations of the incident light with respect to the ATR plate [29, 30]. 400 scans were recorded at a resolution of 4 cm<sup>-1</sup>. All the orientation information is then contained in the dichroic ratio  $R_{ATR} = A_p/A_s$ , where  $A_i$  respectively represents the absorbance of the considered band at *p* or *s* polarization of the incident light.

The resulting spectra were analyzed with an algorithm based on a second-derivative function and a self-deconvolution procedure (GRAMS and OMNIC softwares, ThermoFisher Scientific) to determine the number and wavenumber of individual bands within the spectral range 1600–1690 cm<sup>-1</sup>. The amide I band of each spectrum could be fitted by four bands assigned to the vibration of amide I involved in four different secondary structures (Fig. S2). Vibrational assignments of the infrared band components in the amide I region were made according to Goormaghtigh *et al.* [29, 30]. The fit was obtained with a mixed Lorentzian (25%)–Gaussian (75%) band profile and width at half-height included between 20% and 25%. The relative contributions of the different bands were determined from the fit results obtained for the amide I band. The amount of each secondary-structure element is given as a percentage (Table 2) and is determined by dividing the integral intensity of one amide I band component by the total intensity of all amide I band components. The standard error does not exceed 1.5%. For all spectra, fit results correspond to a local minimum at the end of the iteration procedure.

### **1.9. Calcein leakage experiments**

Calcein-containing LUVs were made using the same protocol used to make regular LUVs, except for the hydration step of the lipid films that was made with Tris buffer containing 70 mM calcein. The protocol to prepare calcein-loaded vesicles was the same as previously described by Jobin *et al.* [31]. For the assay, the lipid concentration was set at 1 μM and peptide concentration was allowed to vary from 10 nM to 100 nM (P/L ratio of 1/100 to 1/10 respectively). All measurements were performed on 96-well microplates using a Perkin Elmer LS55 spectrometer (Buckinghamshire, UK). Data were collected every minute at room temperature using a  $\lambda_{exc}$  at 485 nm and  $\lambda_{em}$  at 515 nm with an emission and excitation slit of 2.5 nm.

The fluorescence intensity at the equilibrium was measured after 1.5 hours. At the end of the assay, complete leakage of LUVs was achieved by adding 10 μL of 10% Triton X-100 solution

dissolving the lipid membrane without interfering with the fluorescence signal. The percentage of calcein release was calculated according to the following equation:

$$\% \text{ calcein leakage} = \frac{F_t - F_0}{F_f - F_0} * 100 \quad (1)$$

where the percent of calcein leakage is the fraction of dye released (normalized membrane leakage),  $F_t$  is the measured fluorescence intensity at time  $t$ , and  $F_0$  and  $F_f$  are respectively the fluorescence intensities at times  $t=0$ , and after final addition of Triton X-100, respectively. A dilution correction was applied on the fluorescence intensity after injection of the Triton X-100. Each experiment was repeated three times.

### 1.10. Fluorescence spectroscopy measurements

#### *Nernst Partition Coefficient experiments*

Peptide–phospholipid interactions were studied by monitoring the changes in the Trp fluorescence emission spectra of the peptides upon addition of LUVs. Intrinsic Trp fluorescence of the peptides was measured before and after addition of different amounts of phospholipid vesicles to a 0.5  $\mu\text{M}$  peptide solution. Trp fluorescence was measured at room temperature on a Spex Fluoromax-4 (Horiba) spectrofluorometer.

Emission spectra were recorded between 300 and 500 nm with an excitation wavelength of 280 nm, slit widths of 5 nm for excitation and 10 nm for emission. Peptide–lipid binding was determined from the quenching of the intrinsic Trp fluorescence intensity of the peptides upon addition of LUVs. The maximum fluorescence intensity was plotted vs. the added lipid concentration and fitted using the simple partition model (2), the self-quenching model (3) and the three-state partition model well described by Melo & Castanho [32]. The data were analyzed using Origin.

$$\frac{I}{I_w} = \frac{1 + K_p \gamma_L [L] I_L / I_w}{1 + K_p \gamma_L [L]} \quad (2)$$

$$\frac{I}{I_w} = \frac{1 + K_p \gamma_L [L] I_L / I_w}{1 + K_p \gamma_L [L] + k_2 K_p I_L} + \frac{1}{1 + K_p \gamma_L [L]} \quad (3)$$

where  $[L]$  is the total phospholipid concentration available for the peptide to interact with,  $K_p$  is the Nernst partition constant,  $k_2$  is proportional to the ratio between the bimolecular self-quenching rate and the radiative decay rate,  $\gamma_L$  is the phospholipids molar volume, which is  $0.763 \text{ M}^{-1}$  for the lipid used in this study.  $I_L$  and  $I_w$  are the fluorescence intensities the mixture would display if all the peptide was in the lipidic or aqueous phase, respectively.  $I_w$  can be obtained from the measurement

of  $I$  in the absence of lipid;  $I_L$  is a limit value of fluorescence intensity as  $[L] \rightarrow \infty$  and is determined as a system parameter together with  $K_p$ .

### *Brominated Lipid Quenching Experiments*

Depth-dependent fluorescence quenching of tryptophan was performed in LUVs composed of DOPC, DOPC:DOPG 4:1, and either (6,7)-, (9,10)-, or (11,12)-BrPC at molar ratios of 70:30 with DOPC:BrPC and 50:20:30 with DOPC:DOPG:BrPC. Fluorescence intensities in absence of quencher ( $F_0$ ) were measured in DOPC and DOPC:DOPG (4:1) vesicles. Spectra were recorded between 300 and 500 nm with an increment of 1 nm and an integration time of 0.1 s, using an excitation wavelength of 280 nm. The P/L molar ratio was 1:50 and the peptide concentration was 0.5  $\mu\text{M}$  (for RW9, RWFF9, RFWF9 and RWWF9) and 0.8  $\mu\text{M}$  (for RFWW<sub>9</sub>). Data were corrected for vesicle background, and the total intensity was calculated as the sum of all measured points in each spectrum. Depth-dependent fluorescence quenching profiles (DFQPs) were fitted to data in Matlab using the distribution analysis (DA) method [33, 34] as well as the parallax method (PM) [35-38].

$$\text{DA: } \ln \frac{F_0}{F_{(h)}} = \frac{S}{\sigma \sqrt{2\pi}} \exp \left[ -\frac{(h - h_m)^2}{2\sigma^2} \right] \quad (4)$$

$$\text{PM: } \ln \frac{F_0}{F_{(h)}} = \pi C [R_c^2 - (h - h_m)^2] \quad (5)$$

In the equations above,  $F_0$  is the fluorescence intensity in absence of quencher,  $F_{(h)}$  is the intensity in the presence of quencher at the distance  $h$  ( $\text{\AA}$ ) from the bilayer center, and  $h_m$  is the average insertion depth of the tryptophan residues. In DA the DFQP data are fitted with a Gaussian function where  $\sigma$  denotes the dispersion, which is related to the in-depth distribution of the tryptophan chromophores, and  $S$  is the area under the quenching profile, which is related to the quenchability of the tryptophan moiety. The parallax method fits data to a truncated parabola, and  $R_c$  is the radius of quenching. Average bromine distances from the bilayer center ( $h$ ) were taken to be 11.0, 8.3, and 6.5  $\text{\AA}$  for (6,7)-BrPC, (9,10)-BrPC and (11,12)-BrPC, respectively [38].

### *Acrylamide quenching experiments*

Peptide-lipid interactions are accompanied by changes in the accessibility of the peptides to aqueous quenchers of Trp fluorescence. Acrylamide quenching experiments were carried out on a 0.5  $\mu\text{M}$  peptide solution in the absence or presence of LUVs by addition of aliquots of 4 M acrylamide solution. The peptide/lipid mixtures (P/L molar ratio of 1/50) were incubated for 15 min at room temperature prior to the measurements. The excitation wavelength was set to 295 nm instead of 280 nm to reduce absorbance by acrylamide. Fluorescence intensities were measured after addition of quencher at room temperature. The quenching constants were obtained from the slope of the Stern-Volmer plots of  $F_0/F$  vs. [quencher], with  $F_0$  and  $F$  are the fluorescence intensities

in the absence and presence of quencher, respectively. The normalized accessibility factor (naf) was calculated in comparison with the  $K_{sv}$  for each peptide in buffer.

### **1.11. Plasmon Waveguide Resonance measurements**

Experiments were performed on a beta PWR instrument from Proterion Corp. (Piscataway, NJ) that had a spectral angular resolution of 1 mdeg. The technique used to form supported bilayers was the same that the one previously described by Salamon *et al.* [39-41]. Data were fitted (GraphPad Prism) through a hyperbolic saturation curve providing the dissociation constants. It should be noted that since concomitantly with the binding process other processes, such as membrane reorganization and solvation occur, the dissociation constants correspond to apparent dissociation constants. In order to test for binding reversibility following peptide binding at saturating concentrations, the PWR cell sample was washed twice, by flowing buffer through the cell. Following that the spectra were acquired for both polarizations. A comparison of the resonance angles before and after washing gives information about the reversibility in the P/L interaction.

## **2. Results & discussion**

### **2.1. Effect of the peptides on the cell viability**

The cell viability was tested with all RX9 peptides and was first studied to investigate whether the replacement of Trp residues changes their cytotoxicity (Table 2). The cell viability was measured on CHO-K1 cells using the CCK8 test providing the rate of viable cells. Concentrations varied between 5 and 50  $\mu$ M and peptides were incubated for 1, 6 and 24 hours at 37°C. None of the peptides has shown any significant cytotoxicity at these concentrations at 1h (which corresponds to the incubation time used to quantify cellular uptake). However we noticed a decrease of the cell viability for longer incubation time (6h and 24h). This demonstrates that the replacement of Trp by Phe residues in the sequence affects the cytotoxicity of the peptides.

	1h	6h	24h
RFFF9	104 ± 13	65 ± 10	105 ± 2
RFFW9	104 ± 25	66 ± 10	90 ± 5
RWFF9	91 ± 28	62 ± 9	78 ± 8
RFWF9	103 ± 23	57 ± 9	78 ± 5
RFWW9	85 ± 14	51 ± 8	76 ± 4
RWWF9	80 ± 20	51 ± 8	76 ± 20
RWWF9	75 ± 6	54 ± 8	77 ± 9

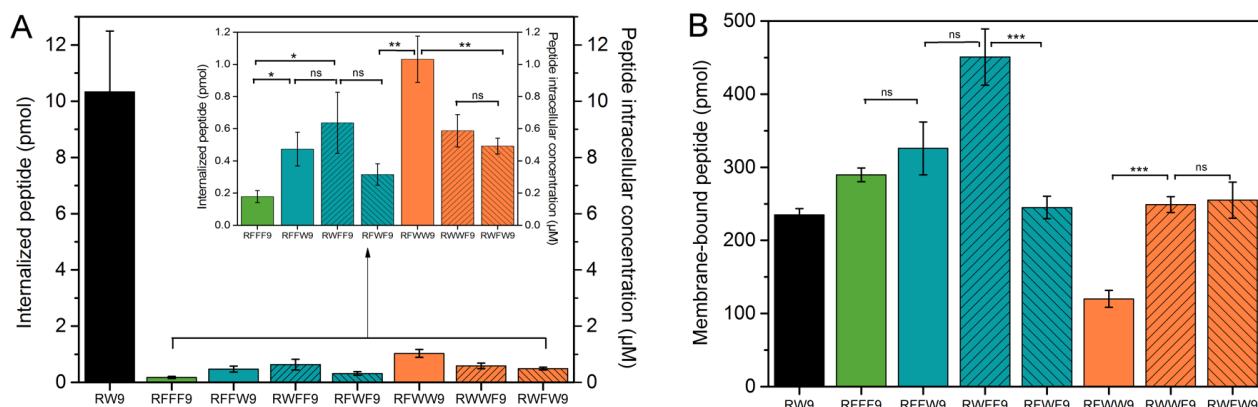
**Table 2.** Viability assays (in percentage) for the RX9 peptides for a peptide concentration of 5  $\mu$ M and with different incubation times. The experiments have been performed twice and each time in triplicate.

## 2.2. Quantification of cellular uptake and membrane-bound peptide

Quantification of cellular uptake of each peptide was investigated by a protocol already published that uses MALDI-TOF mass spectrometry as the analytical technique [28]. The experiments were performed with CHO-K1 cells at 37°C, a temperature at which both endosomal and cytosolic peptides were quantified and at which peptides can enter by both endocytosis and direct translocation.. The results show that all RX9 peptides are much less internalized (~1 pmol or less) than RW9 (~10 pmol), about a ten-fold decrease (Fig. 1A). The least internalized peptide (only ~0.2 pmol) is observed for the analog containing no Trp residues (RF9). The analogs containing 1 or 2 Trp residues are slightly more internalized (~1 pmol) than RF9 but show no difference between them. The results indicate that the presence of Trp residues in RW9 analogs is important for their cellular internalization. Since the first contact between the peptide and the cell is through the cell membrane, quantification of membrane-bound peptide was performed. Overall, the results show that RX9 peptides accumulate in the membrane in the same extent as RW9 (~250 pmol) (Fig. 1B). Membrane accumulation at 4°C provides similar results (data not shown). In terms of the two extreme behaviors, the peptide RWFF9 accumulates the most in the membrane (~ 450 pmol), while the peptide RFWW9 accumulates the least (~100 pmol). These results show that the presence of Trp residues is important for RX9 cellular internalization. No correlation exists between the amount of membrane-bound and that of internalized peptide in the RX9 series.

From the cellular uptake results we have selected for further studies 5 peptides that appeared to be the most representative of the RX9 series, notably with variable number of Trp residues and significant differences in internalization capacities. We have therefore chosen the peptide without Trp residues (RF9), 2 peptides containing 1 Trp (RFWF9 and RWFF9) and 2 peptides with 2 Trp (RFWW9 and RWWF9). Biophysics experiments aimed at characterizing their interaction with

lipid membranes in an attempt to correlate that with the differences in terms of cellular uptake efficacy were performed on the 5 selected peptides (described in next sections).



**Figure 1.** (A) MALDI-TOF MS quantification of RX9 and RW9 internalization in 1 million CHO-K1 cells after peptide incubation for 1h at 37 °C. (B) Membrane-bound peptide quantification on CHO-K1 cells (1 million) determined by mass spectrometry (MALDI-TOF) at 37°C. Significance was tested using a Student t test : ns :  $p > 0,05$  ; \*  $0,01 < p < 0,05$  ; \*\*  $0,01 < p < 0,001$  ; \*\*\*  $p < 0,005$ .

### 2.3. Peptide secondary structure

As with RW9, the CD spectra of the RX9 peptides were strongly affected by the  $\pi$ - $\pi$  stacking occurring between aromatic residues [19]. In the case of RF9, RFWW9 and RWWF9 (3 Phe and 1 respectively), a negative band around 230 nm was also observed that prevented proper spectral decomposition (Fig. S1). This band is negative in the case of the RWWF9 and positive in the case of the RFWF9 as it depends on the orientation of the aromatic residues. Peptides with 2 Phe (RFFW9 and RWFF9) gave more interpretable results as no absorbance was observed at 230 nm allowing data decomposition and secondary structure determination. In buffer and in presence of zwitterionic lipids, the peptides are in random coil conformation with a small  $\alpha$ -helix contribution (~10%; Fig. S1). In presence of anionic lipids, 2 negative bands at 208 and 222 nm are observed indicating  $\alpha$ -helix structuration (~20%; Fig.S1). Helical structuration in presence of anionic liposomes was also observed in the case of RW9 [19]. Moreover a preferential  $\pi$ -cation interaction between residues Arg<sup>8</sup> and Trp<sup>4</sup> and Trp<sup>7</sup> was evidenced by solution NMR by Walrant *et al.* [19]. Since we replaced Trp<sup>4</sup> and Trp<sup>7</sup> by Phe in some cases, those interactions might have been affected. Indeed, the most internalized peptide for the RX9 series is RFWW9, which retains Trp<sup>4</sup> and Trp<sup>7</sup> and thus preserves these interactions. Therefore  $\pi$ -cation interactions seem to affect peptide internalization. This is to be expected since such interactions partially mask the charge of the peptide allowing a less energetically unfavorable membrane crossing.



The results indicate that the replacement of some Trp by Phe residues does not change the secondary structure of RX9 in interaction with lipids and so the secondary structure upon lipid contact is not directly correlated to the internalization. The possibility of a correlation between the capacity of a CPP to adopt a particular secondary structure and to translocate is so far not clear in the literature. For example in the case of penetratin it has been shown that  $\alpha$ -helical structure is not necessary for its internalization [8, 44].

Peptides	Buffer				DOPC				DOPC:DOPG			
	RC*	$\alpha$ -helix	$\beta$ -sheet	$\beta$ -turn	RC*	$\alpha$ -helix	$\beta$ -sheet	$\beta$ -turn	RC*	$\alpha$ -helix	$\beta$ -sheet	$\beta$ -turn
<b>RFFF9</b>	19	35	32	14	24	37	11	28	20	41	27	12
<b>RWFF9</b>	29	41	11	19	28	46	12	14	30	28	31	11
<b>RFWF9</b>	22	33	19	26	19	34	20	27	32	33	28	7
<b>RFWW9</b>	52	26	7	15	23	38	27	12	29	37	26	8
<b>RWWF9</b>	30	31	22	17	25	38	22	15	31	40	18	11

**Table 3.** RX9 peptides secondary structure percent determined by ATR-FTIR spectroscopy.

\*RC: random coil

The secondary structure of the peptides in contact with lipids was also investigated by ATR-FTIR spectroscopy to avoid this issue caused by the aromatic residues (Table 3). We have found that the secondary structures of RX9 peptides were not well defined corresponding mostly to a mixture of peptides adopting different secondary structures. Thus we were unable to perform spectral decomposition and determine with certainty the type and amount of each secondary structure. However we observed a marked increase in helical content in presence of membranes, especially those containing anionic lipids.

#### **2.4. Peptide effect on membranes supramolecular organization and integrity**

Dynamic light scattering (DLS) experiments were performed in order to investigate the influence of the peptides on liposome size and distribution. Measurements were acquired in absence and presence of peptide and at different P/L ratios. Table S1 presents the variation in size distribution of liposomes composed of DOPC, DOPG and DOPC:DOPG (4:1 mol:mol) and for a P/L ratio of 1/50. In the case of DOPC the size of the liposomes was not significantly modified by peptide addition but the size of anionic liposomes (DOPG and DOPC:DOPG) increased importantly (up to 100 nm size increase) in presence of the peptides. This shows that aggregation or fusion of anionic liposomes is induced by peptide addition. The same observation was reported by Walrant *et al.* on the effect of RW9 on anionic lipids by following changes in turbidity [19]. No significant differences among the RX9 analogs were observed indicating that lipid interactions are mostly

driven by electrostatic forces and therefore by the number of Arg residues which is the same for all peptides.

Calcein leakage experiments were performed to investigate whether RX9 peptides perturbed liposome membrane integrity (e.g. pore formation). In the case of anionic liposomes almost no leakage was observed (less than 1%) following 1 h peptide incubation at a P/L ratio of 1/50, meaning that the membrane integrity was not affected by the addition of the RX9 peptides. In the case of zwitterionic liposomes the leakage was slightly higher (below 5%) indicating that RX9 peptides slightly perturbed these liposomes (Table S2). We have observed that the leakage was similar (<5%) for all peptides and at all P/L ratios (1/100 to 1/10; data not shown) so we assumed that this could result from a saturation of the bilayer surface by the peptide that induced a slight leakage. Overall, the results indicate that the peptides do not significantly perturb the membrane integrity (no pore formation), which are in agreement with cell viability results.

## 2.5. Peptide interaction and partitioning with model membranes

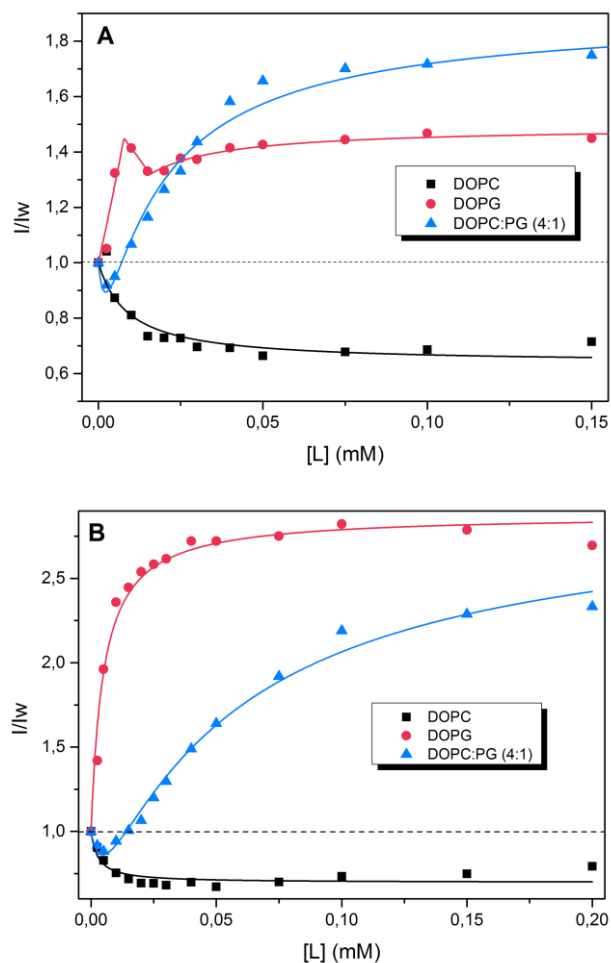
The intrinsic Trp fluorescence of the peptides was used to characterize the partitioning of the RX9 peptides with model membranes. The Nernst partition coefficient ( $K_p$ ) was calculated at a constant peptide concentration from the fluorescence intensity (I) vs. lipid concentration ([L]) plots using the titration method already described [45, 46]. The coefficient  $K_p$  is the ratio between membrane-bound and aqueous phase peptide concentrations. For all lipid systems the  $K_p$  obtained was in the range of  $10^5$  evidencing the importance of electrostatic recognition in P/L interaction [47] (Table 4). This is consistent with the fact that RX9 peptides are positively charged at physiological pH (6+) (Table 1) and thus can establish important electrostatic interactions with the negative phosphate groups in the lipid headgroups. Overall the partition of the different peptides was comparable independently of the lipid composition.

	<b><math>K_p</math> (<math>\cdot 10^5</math>)</b>		
	<b>DOPC</b>	<b>DOPC/DOPG (4 :1)</b>	<b>DOPG</b>
<b>RW9</b>	$2.0 \pm 0.8$	$3.8 \pm 0.2$	$1.5 \pm 0.6$
<b>RWFF9</b>	$4.6 \pm 0.5$	$3.1 \pm 0.5$	$1.6 \pm 0.2$
<b>RFWF9</b>	$2.15 \pm 0.05$	$1.765 \pm 0.005$	$1.88 \pm 0.07$
<b>RFWW9</b>	$3.4 \pm 0.7$	$1.77 \pm 0.06$	$2.51 \pm 0.07$
<b>RWWF9</b>	$3.0 \pm 0.5$	$0.9 \pm 0.6$	$1.4 \pm 0.2$

Note: the experiments have been done in duplicate

**Table 4.** Partition coefficients ( $K_p$ ) of the RX9 peptides with increasing concentration of liposomes (from 2.5  $\mu$ M to 200  $\mu$ M) at constant peptide concentration (0.5  $\mu$ M).

Even though the  $K_p$  among the RX9 and RW9 peptides was the same, partition curves were different depending on liposome composition. In the case of DOPC fluorescence intensity of the peptides decreased upon lipid contact with a hyperbolic behavior but with no shift in the maximum wavelength fluorescence (Fig. 2). This results from dynamic quenching of the Trp fluorescence following the interaction of the peptides with the lipid polar headgroups. The absence of shift in the maximum wavelength fluorescence upon lipid contact suggests that the peptide might be adsorbed to the membrane with the same hydrophilic environment as when in solution and therefore it is not deeply inserted in the hydrophobic core.



**Figure 2.** Partition curves of RW9 (A) and RFW9 (B) peptides in the presence of liposomes. The peptide concentration used was 0.5  $\mu$ M and the lipid stock concentration was 0.1 mM and 1 mM. The data were fitted with equation (2) for DOPC and DOPG curves in the case of RFWF9, RFW9 and RWWF9, the equation (3) was used to fit the DOPC:DOPG (4:1 mol:mol) curves and the three-state model equations were used to fit DOPG curves of RW9 and RWWF9.

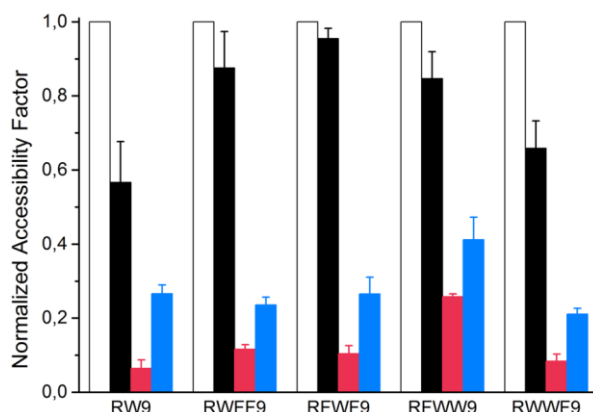
This behavior was slightly different in presence of liposomes containing DOPG (DOPC:DOPG 4:1). The same decrease in fluorescence intensity was observed at low lipid concentrations and then at a higher lipid concentration a hyperbolic increase appeared along with a

blue shift of  $\sim 10$  nm in the maximum fluorescence intensity (Fig. 2). This behavior has already been reported and results from peptide self-quenching upon bilayer insertion [32, 48]. The Trp inserts more deeply in the bilayer at the lipid acyl chain region changing its environment to a more hydrophobic one. This different behavior in terms of Trp fluorescence in presence of anionic lipids in the membrane was confirmed with experiments on pure DOPG liposomes where a three-step process was observed (Fig. 2A). In the first phase, at low lipid concentrations, the maximum fluorescence intensity increases but no blue shift appears indicating that the peptide interacts with the membrane without inserting deeply in the hydrophobic core. This first superficial contact might be the consequence of strong electrostatic interactions between the Arg and the negative charges of DOPG. In the second phase, at higher lipid concentrations, a large blue shift is observed ( $\sim 20$  nm) with a small decrease in intensity for certain peptides (RW9 and RWFF9) followed by an increase until a plateau is reached (Fig. 2A). For the peptides RFWF9, RFWW9 and RWWF9, the curve profile is only hyperbolic. This increase in fluorescence maximum is due to solvent effects, which increase Trp quantum yield that is also evidenced by the blue-shift. This corroborates with a deep insertion of the peptide into the bilayer with the Trp residues oriented toward the hydrophobic core of the membrane. This two-stage membrane interaction and insertion was already proposed by Walrant *et al.* for RW9, demonstrating that Arg residues act as an hinge by means of, in an initial stage, electrostatic interactions with the anionic lipids and then a deeper Trp insertion in a second stage [49].

The  $K_p$  observed was similar among the RX9 peptides and more surprisingly for the different lipid systems. This indicates that the proportion of membrane-bound peptide, relative to the free one, is the same whatever the membrane composition but the kinetics and affinity of interaction might be different (this is further described below). The number and position of Trp does not seem to affect the partitioning of the peptides in the membrane indicating that electrostatic interactions play a major role in this process.

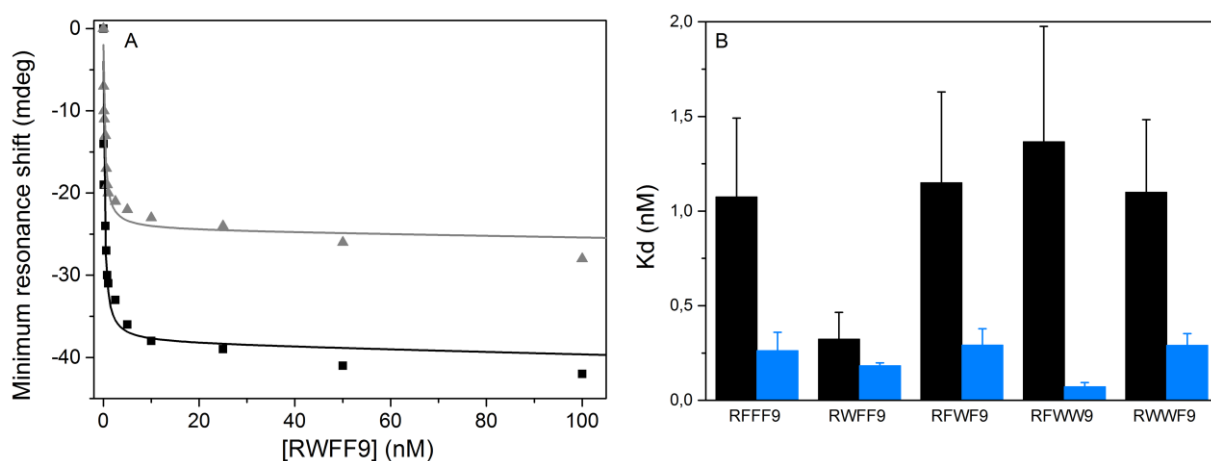
Based on the blue shift observed with anionic liposomes we could determine a “half-binding” corresponding to the concentration of lipids necessary to reach 50% of the blue-shift (Fig. S2). The half-binding was much lower with DOPG than with DOPC:DOPG LUVs. This confirms that peptide interaction with the membrane is enhanced in presence of anionic lipids. To further investigate the insertion of the peptides into liposomes of different composition, we have calculated the Stern-Volmer constant ( $K_{SV}$ ) by doing acrylamide-quenching experiments (Fig. 3). We have normalized the results to the  $K_{SV}$  in the buffer to obtain the normalized accessibility factor (naf). This allows us to compare the results obtained among the different peptides. The results show that Trp residues of all peptides upon contact with zwitterionic liposomes are almost totally exposed to the buffer (60 to 90% of accessibility). They are more buried in the presence of partially anionic liposomes (20 to 30 % of accessibility) and almost completely with pure DOPG liposomes (10 to 20

% of accessibility). No significant differences were observed among the RX9 and RW9 peptides with this technique.



**Figure 3.** Normalized accessibility factor (naf) of the RX9 peptides determined from the Stern-Volmer constants normalized relatively to the  $K_{SV}$  in buffer. The bars represent the naf for buffer (white), DOPC (black), DOPG (red) and DOPC:DOPG (4:1 mol:mol) (blue) liposomes. Experiments were done in triplicate at room temperature.

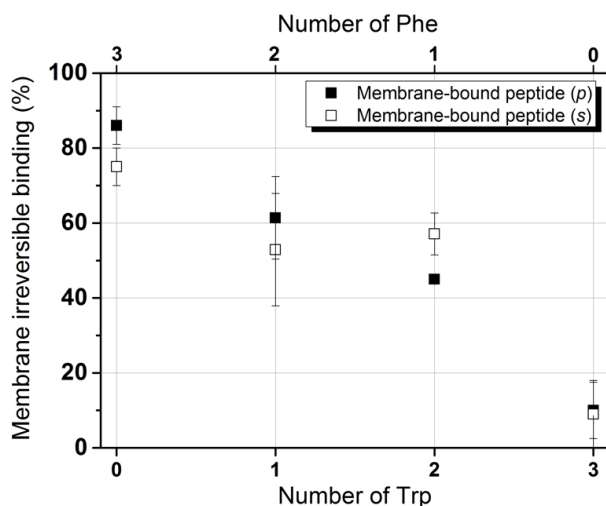
Plasmon Waveguide Resonance (PWR) was used to study the affinity of the RX9 for zwitterionic and anionic lipids and effect in the membrane organization. Upon peptide addition a decrease in the resonance angle was observed for both *p*- and *s*-polarization indicating that a decrease in the mass of the system occurs upon peptide addition (Fig. 4). This might be due to a detergent effect of the peptide leading to partial removal of lipid from the membrane or to a reorganization of the lipids induced by the peptide leading to an overall higher surface area occupied by each lipid.



**Figure 4.** Interaction of the peptides with the bilayer monitored by PWR. (A) Shifts in the resonance minimum upon interaction of increasing concentrations of peptide with the bilayer for *p*- and *s*-polarization (black curve and grey curve respectively). (B) Dissociation constants ( $K_D$ )

determined with PWR for peptide interaction with EggPC (black bars) and EggPC:POPG (4:1 mol:mol) (blue bars) supported bilayers. The experiments were done in triplicate.

By following the resonance position shifts upon incremented addition of peptide and fitting with a hyperbolic function,  $K_D$  values were obtained (see Materiel & methods for details). An affinity in the nanomolar range was observed for all peptide interactions and both membrane compositions; however the affinity was slightly higher in the case of anionic lipids ( $K_D \sim 1$  nM for zwitterionic lipids and  $\sim 0.2$  nM for anionic lipids; Fig. 4B). This agrees well with the results obtained by fluorescent studies ( $K_{SV}$  and “half-binding” constants) presented previously, indicating enhanced interaction and insertion with anionic lipids. After reaching peptide saturation (plateau), the lipid membrane was washed by flowing buffer through the cell in order to test whether peptide binding and effect on membranes was reversible. We observe a correlation between the number of Trp residues and the reversibility of the interaction, the lower the number of Trp residues, the less reversible being the interaction (Fig. 5). We interpret this observation as follows: Phe residues being more hydrophobic than Trp it allows the peptide to be more deeply inserted in the membrane and therefore in a less reversible and a more permanent manner. Washing the membrane in the case of RW9 leads to an almost complete recovery of the membrane signal obtained before peptide addition (almost completely reversible binding). The data allow us to conclude that the aromaticity of the amino-acids is important for the peptide membrane translocation but a high hydrophobicity of such residues prevents the peptide translocation due to a deeper and/or more irreversible lipid interaction.



**Figure 5.** Percentage of “washing-resistant” or irreversible membrane-bound peptide after a washing step of the PWR cell (2 mL) represented as a function of the number of Trp residues.

## 2.6. Peptide insertion in the membrane

The studies of tryptophan fluorescence quenching by brominated lipids provide information about the membrane insertion level of the peptides. The Trp insertion depth from the bilayer center for the RX9 analogs was obtained for DOPC/DOPG (4:1) LUVs. The average Trp insertion level of the RX9 and RW9 is around 10-11 Å from the membrane center, according to both Distribution Analysis (DA) and Parallax Method (PM) analysis (Table 5; Fig. S3), thus Trp residues are located just below the lipid polar headgroups. Overall the peptides with 2 Phe residues are slightly more inserted in the bilayer ( $\sim 9$  Å) than the one with 1 Phe ( $\sim 11$  Å). This is consistent with the reversibility of the binding of the peptides observed with PWR.

	DA			PM	
	$h_m$ (Å)	$\sigma$ (Å)	S	$h_m$ (Å)	$R_c$ (Å)
<b>RW<sub>9</sub></b>	$10.4 \pm 0.9$	$5.8 \pm 1.2$	$1.3 \pm 0.5$	$10.2 \pm 0.7$	$8.2 \pm 1.4$
<b>RWFF<sub>9</sub></b>	$9.7 \pm 0.5$	$2.6 \pm 0.4$	$0.6 \pm 0.1$	$9.9 \pm 0.8$	$4.8 \pm 1.2$
<b>RFWF<sub>9</sub></b>	$9.9 \pm 0.2$	$2.3 \pm 0.4$	$0.3 \pm 0.1$	$10.6 \pm 0.9$	$5.1 \pm 0.4$
<b>RFWW<sub>9</sub></b>	$11.2 \pm 1$	$2.9 \pm 1$	$0.7 \pm 0.5$	$12.7 \pm 0.1$	$7 \pm 1$
<b>RWWF<sub>9</sub></b>	$11 \pm 0.8$	$3.8 \pm 1.2$	$0.9 \pm 0.6$	$11.1 \pm 0.5$	$6.5 \pm 1.3$

Note: The experiments have been done on in triplicate at room temperature.

**Table 5.** Average insertion depth of the peptides in DOPC:DOPG (4:1 mol:mol) LUVs determined by the Distribution Analysis (DA) and Parallax Methods (PM) together with the respective method fitting parameters.

The study shows that the higher hydrophobicity of the Phe plays an important role in peptide insertion and depth in anionic membranes. If one assumes that the peptides are mostly structured in helical conformation their backbone should be located around 16 Å from the bilayer center. Molecular dynamic simulation (MDS) data obtained on RW9 show an insertion depth of the peptide backbone of 14 Å from the bilayer center. The results are thus comparable, the small difference observed can arise from the time range differences between the two experiments that are much longer in these studies than in MDS. We could not obtain results with DOPC liposomes with the brominated lipid quenching experiments. This could be due to the fact that with DOPC the peptides interact more superficially and with slightly smaller affinity than with anionic liposomes.

The peptide effect on the membrane lipid orientation and organization was examined by polarized ATR-FTIR experiments (Table 6). Such experiments allow one to calculate the dichroic ratio ( $R_{ATR} = A_p/A_s$ ) relative to the symmetric  $CH_2$  vibration mode ( $\nu_s CH_2$ ) of the lipid chains (around  $2853\text{ cm}^{-1}$ ) and how that was affected by the peptides. Such ratio provides information

about the peptide effect on the lipid chain ordering and orientation. We have observed a slight increase in the  $R_{ATR}$  of DOPC lipids in presence of most of the RX9 peptides (except RWFF9) corresponding to a slight disorganization of the lipid chains. On the contrary a slight decrease of the  $R_{ATR}$  was observed with anionic membranes (DOPC:DOPG 4:1) indicating that the peptide further organized these lipids. This probably results from the fact that peptide interaction with anionic lipids leads to a decrease of the repulsive forces between the lipid headgroups and thus an increase in ordering and packing of the membrane. This correlates well with calcein leakage experiments in which no leakage was observed with anionic lipids and a slight leakage was observed with zwitterionic lipids. However no significant differences were evidenced among the RX9 peptides leading us to conclude that membrane perturbation induced by the peptides is not a property that could explain the observed differences in cellular internalization.

<b>Peptides</b>	<b>DOPC</b>	<b>+ Peptide</b>	<b>DOPC:DOPG</b>	<b>+ Peptide</b>
<b>RFFF9</b>	$1.45 \pm 0.1$	$1.62 \pm 0.08$	$1.4 \pm 0.09$	$1.42 \pm 0.03$
<b>RWFF9</b>	$1.53 \pm 0.1$	$1.47 \pm 0.1$	$1.5 \pm 0.06$	$1.35 \pm 0.1$
<b>RFWF9</b>	$1.44 \pm 0.1$	$1.5 \pm 0.1$	$1.41 \pm 0.05$	$1.33 \pm 0.05$
<b>RFWW9</b>	$1.39 \pm 0.07$	$1.46 \pm 0.01$	$1.39 \pm 0.07$	$1.38 \pm 0.05$
<b>RWWF9</b>	$1.28 \pm 0.09$	$1.4 \pm 0.1$	$1.4 \pm 0.04$	$1.37 \pm 0.09$

**Table 6.** Dichroic ratio ( $R_{ATR}=A_p/A_s$ ) of symmetric carbonyl lipid stretching ( $\nu_s$  CH<sub>2</sub>) around 2853 cm<sup>-1</sup> for DOPC and DOPC:DOPG (4:1 mol:mol) in the absence and in the presence of 5 nmol of RX9 peptides.

### 3. Conclusion

Herein we have investigated the role of Trp residues in the cellular internalization and membrane interaction properties of the RW9 CPP. While arginine role has been thoroughly investigated and established [50, 51] that of aromatic residues has received far less attention. For RW9, the substitution of Trp by Leu residues has been reported to remove the cell penetrating ability of the peptide pointing to the importance of Trp residues [19]. On the contrary, R9 is known as a performing CPP from previous studies [7, 19], leaving open questions on the role of aromatic residues. The substitution of Trp by Phe residues in the RW9 sequence lead to major decrease in the cellular internalization, which was almost abolished for the peptide containing no Trp residues. In contrast, their membrane accumulation was retained.

Different modes of CPP internalization, direct translocation and endocytosis, can occur. Direct translocation implies that the peptides directly reach the cytosol of cells. In contrast, a



peptide that enters through endocytosis, a process that is inhibited at temperatures below 12°C, ends up into endosomes from which it has to escape to reach the cytosol of cells. For drug delivery purposes, only the fraction of the peptide that is not entrapped in endosomes is relevant.

RW9 has been shown previously to enter cells by both direct translocation of the plasma membrane and endocytosis [19]. By comparing RW9 cellular uptake at 4 and 37°C in wild-type (wt) and GAG-deficient CHO cells, it was found that 85% of the CPP internalized in wt cells at 37°C entered by GAG-dependent endocytosis and 15% by direct translocation. We observed here that internalization of all the RX9 peptides at 37°C is extremely low and is in almost all cases decreased more than 10 times compared to RW9. This suggests that both endocytosis and direct translocation are affected by the replacement of Trp residues with Phe residues. However, we could not perform internalization experiments at 4°C with the RX9 peptides to measure their entry exclusively by direct translocation because as shown, the amounts of internalized peptide were already quite low at 37°C. At 4°C due to endocytosis blockage, one expects the internalization to be even lower, as observed for RW9 peptide [19], and therefore impossible to measure for the RX9 peptides.

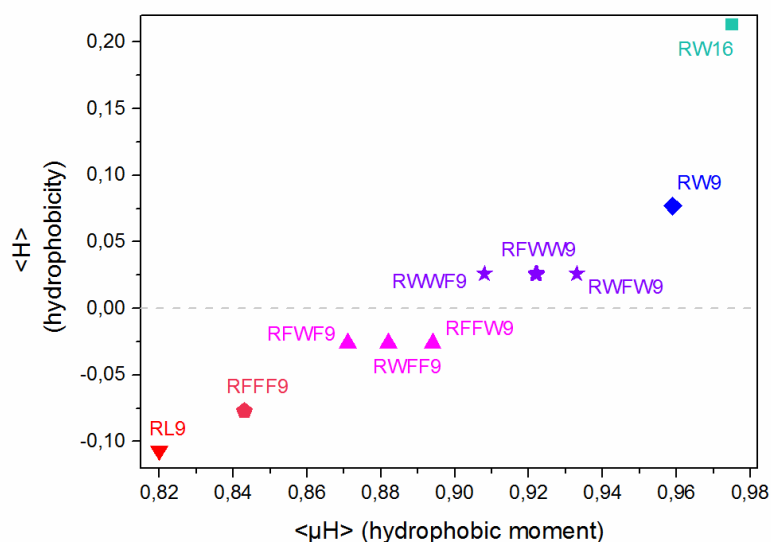
The role of Trp residues in the recruitment of cell-surface GAGs to trigger endocytosis has been investigated before using biophysical methods [12, 52]. In contrast, the implication of this amino acid in direct translocation is still not fully understood, although Rydberg *et al.* have recently highlighted that tryptophan position in dodecapeptide Arg/Trp sequences affects cytotoxicity and the way these peptides interact with the different model membranes [53, 54].

We performed here a complete biophysical study of RW9 and RX9 analogs aimed at correlating their cellular uptake properties to better understand the role of Trp residues in direct translocation of the plasma membrane. We showed that in the presence of lipids their secondary structure was not modified even if they are mostly unstructured. Contrarily to what the literature suggests for some CPPs [55], the cellular internalization of these peptides is not directly correlated to their secondary structure.

Despite the fact that all peptides accumulate and partition in the membrane in the same way, we concluded that their anchoring in the membrane is directly dependent on the hydrophobicity and interfacial properties of the amino-acids. Arg residues drive their binding to the membrane and are responsible for their membrane accumulation and partition, explaining their enhanced interaction with anionic lipids. Following such interaction, Arg residues play the role of hinge allowing insertion of the hydrophobic residues more deeply into the membrane. At this point the nature of the hydrophobic residues is detrimental to the CPP fate in terms of the reversibility of the membrane interaction and ultimate membrane crossing. Indeed our studies reveal that less hydrophobic residues and more interfacial ones will help the peptides to establish more transitory interactions

with the membrane in part due to a less deep membrane insertion. Such malleable membrane interaction and peptide structural change is important to avoid the peptide from being retained in the membrane interior and to trigger translocation into membranes. This study demonstrates that not only the number but also the nature and the positioning of the hydrophobic residues, their aromaticity and interfacial properties are important for their membrane translocation. Penetrating properties are favored when Trp residues form a large hydrophobic peptide face. Additionally, Trp residues in positions 4 and 7 of the RW9 sequence have been shown to promote  $\pi$ -cation interactions important to partially mask the peptide charge and decrease the energy barrier for membrane translocation [19]. Overall, membrane interaction should allow peptide accumulation but a deep membrane insertion should be avoided in order to favor more transitory interactions and allow membrane translocation.

To reinforce this idea, we have calculated the hydrophobic moment for all RW9 and RX9 peptides, the helical projections of the peptides were performed (Figure S5) and a plot representing hydrophobicity vs. hydrophobic moment of the peptides allowed us to visualize the differences in term of hydrophobicity between each peptide (Figure 6). Hydrophobic plot indicated that diminution of hydrophobicity and amphipathicity of the RX9 peptides decreases its cellular uptake and that the substantial increase of these parameters leads to an increase of their cytotoxicity. This suggests that a fine tuning of these parameters exists to enhance CPP internalization and that above this threshold value toxicity starts to develop.



**Figure 6.** Hydrophobic plot of RW9, the analogues RX9 and two similar cell-penetrating peptides RL9 and RW16. The abscissa gives the helical hydrophobic moment ( $\langle \mu_H \rangle$ ) of each peptide and the ordinate gives the corresponding values of hydrophobicity ( $\langle H \rangle$ ). The peptide the most internalized is represented in blue with a gradient to the red for the peptides the less internalized. RW16 is represented in light blue and is well internalized with increasing cytotoxicity.

## **Acknowledgements**

This work was funded by the French Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche. We thank Cathy Staedel (Inserm U869, Univ-Bordeaux) for providing CHO-K1 cells and Alexandra Milochau and Julien Gaitan (CNRS UMR5248 CBMN Univ-Bordeaux) for the assistance in cell culture for cytotoxicity tests. We thank Gérard Bolbach (CNRS UMR7203 LBM UPMC Univ-Paris6) for assistance in the use of the MALDI-TOF mass spectrometry. We thank Manuel N. Melo for his help with the fitting of the three-state model in Trp fluorescence.

## **References**

- [1] G.P. Dietz, M. Bahr, Delivery of bioactive molecules into the cell: the Trojan horse approach, *Mol Cell Neurosci*, 27 (2004) 85-131.
- [2] A.D. Frankel, C.O. Pabo, Cellular uptake of the tat protein from human immunodeficiency virus, *Cell*, 55 (1988) 1189-1193.
- [3] M. Green, P.M. Loewenstein, Autonomous functional domains of chemically synthesized human immunodeficiency virus tat trans-activator protein, *Cell*, 55 (1988) 1179-1188.
- [4] E. Vives, P. Brodin, B. Lebleu, A truncated HIV-1 Tat protein basic domain rapidly translocates through the plasma membrane and accumulates in the cell nucleus, *J Biol Chem*, 272 (1997) 16010-16017.
- [5] D. Derossi, A.H. Joliot, G. Chassaing, A. Prochiantz, The third helix of the Antennapedia homeodomain translocates through biological membranes, *J Biol Chem*, 269 (1994) 10444-10450.
- [6] P.A. Wender, D.J. Mitchell, K. Pattabiraman, E.T. Pelkey, L. Steinman, J.B. Rothbard, The design, synthesis, and evaluation of molecules that enable or enhance cellular uptake: peptoid molecular transporters, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97 (2000) 13003-13008.
- [7] S. Futaki, T. Suzuki, W. Ohashi, T. Yagami, S. Tanaka, K. Ueda, Y. Sugiura, Arginine-rich peptides. An abundant source of membrane-permeable peptides having potential as carriers for intracellular protein delivery, *J Biol Chem*, 276 (2001) 5836-5840.
- [8] D. Derossi, S. Calvet, A. Trembleau, A. Brunissen, G. Chassaing, A. Prochiantz, Cell internalization of the third helix of the Antennapedia homeodomain is receptor-independent, *J Biol Chem*, 271 (1996) 18188-18193.

- [9] F. Duchardt, M. Fotin-Mleczek, H. Schwarz, R. Fischer, R. Brock, A comprehensive model for the cellular uptake of cationic cell-penetrating peptides, *Traffic*, 8 (2007) 848-866.
- [10] S. El Andaloussi, P. Guterstam, U. Langel, Assessing the delivery efficacy and internalization route of cell-penetrating peptides, *Nat Protoc*, 2 (2007) 2043-2047.
- [11] P. Guterstam, F. Madani, H. Hirose, T. Takeuchi, S. Futaki, S. El Andaloussi, A. Graslund, U. Langel, Elucidating cell-penetrating peptide mechanisms of action for membrane interaction, cellular uptake, and translocation utilizing the hydrophobic counter-anion pyrenebutyrate, *Biochim Biophys Acta*, 1788 (2009) 2509-2517.
- [12] C.Y. Jiao, D. Delaroche, F. Burlina, I.D. Alves, G. Chassaing, S. Sagan, Translocation and endocytosis for cell-penetrating peptide internalization, *J Biol Chem*, 284 (2009) 33957-33965.
- [13] A. Mishra, V.D. Gordon, L. Yang, R. Coridan, G.C. Wong, HIV TAT forms pores in membranes by inducing saddle-splay curvature: potential role of bidentate hydrogen bonding, *Angew Chem Int Ed Engl*, 47 (2008) 2986-2989.
- [14] J.B. Rothbard, T.C. Jessop, P.A. Wender, Adaptive translocation: the role of hydrogen bonding and membrane potential in the uptake of guanidinium-rich transporters into cells, *Adv Drug Deliv Rev*, 57 (2005) 495-504.
- [15] A. Ziegler, J. Seelig, Binding and clustering of glycosaminoglycans: a common property of mono- and multivalent cell-penetrating compounds, *Biophys J*, 94 (2008) 2142-2149.
- [16] A. Ziegler, J. Seelig, Contributions of glycosaminoglycan binding and clustering to the biological uptake of the nonamphipathic cell-penetrating peptide WR9, *Biochemistry*, 50 (2011) 4650-4664.
- [17] B. Christiaens, S. Symoens, S. Verheyden, Y. Engelborghs, A. Joliot, A. Prochiantz, J. Vandekerckhove, M. Rosseneu, B. Vanloo, Tryptophan fluorescence study of the interaction of penetratin peptides with model membranes, *Eur J Biochem*, 269 (2002) 2918-2926.
- [18] D. Delaroche, B. Aussedat, S. Aubry, G. Chassaing, F. Burlina, G. Clodic, G. Bolbach, S. Lavielle, S. Sagan, Tracking a new cell-penetrating (W/R) nonapeptide, through an enzyme-stable mass spectrometry reporter tag, *Anal Chem*, 79 (2007) 1932-1938.
- [19] A. Walrant, I. Correia, C.Y. Jiao, O. Lequin, E.H. Bent, N. Goasdoue, C. Lacombe, G. Chassaing, S. Sagan, I.D. Alves, Different membrane behaviour and cellular uptake of three basic arginine-rich peptides, *Biochim Biophys Acta*, 1808 (2011) 382-393.

- [20] D. Derossi, G. Chassaing, A. Prochiantz, Trojan peptides: the penetratin system for intracellular delivery, *Trends Cell Biol*, 8 (1998) 84-87.
- [21] I.D. Alves, Membrane-active peptides: mechanisms of action, *Curr Protein Pept Sci*, 13 (2012) 601.
- [22] P. Joanne, C. Galanth, N. Goasdoue, P. Nicolas, S. Sagan, S. Lavielle, G. Chassaing, C. El Amri, I.D. Alves, Lipid reorganization induced by membrane-active peptides probed using differential scanning calorimetry, *Biochim Biophys Acta*, 1788 (2009) 1772-1781.
- [23] J. Connor, C. Bucana, I.J. Fidler, A.J. Schroit, Differentiation-dependent expression of phosphatidylserine in mammalian plasma membranes: quantitative assessment of outer-leaflet lipid by prothrombinase complex formation, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 86 (1989) 3184-3188.
- [24] B. Frey, U.S. Gaipf, The immune functions of phosphatidylserine in membranes of dying cells and microvesicles, *Semin Immunopathol*, 33 (2011) 497-516.
- [25] S. Ran, A. Downes, P.E. Thorpe, Increased exposure of anionic phospholipids on the surface of tumor blood vessels, *Cancer Res*, 62 (2002) 6132-6140.
- [26] T. Utsugi, A.J. Schroit, J. Connor, C.D. Bucana, I.J. Fidler, Elevated expression of phosphatidylserine in the outer membrane leaflet of human tumor cells and recognition by activated human blood monocytes, *Cancer Res*, 51 (1991) 3062-3066.
- [27] V.V. Andrushchenko, H.J. Vogel, E.J. Prenner, Optimization of the hydrochloric acid concentration used for trifluoroacetate removal from synthetic peptides, *J Pept Sci*, 13 (2007) 37-43.
- [28] F. Burlina, S. Sagan, G. Bolbach, G. Chassaing, A direct approach to quantification of the cellular uptake of cell-penetrating peptides using MALDI-TOF mass spectrometry, *Nat Protoc*, 1 (2006) 200-205.
- [29] E. Goormaghtigh, V. Cabiaux, J.M. Ruysschaert, Secondary structure and dosage of soluble and membrane proteins by attenuated total reflection Fourier-transform infrared spectroscopy on hydrated films, *Eur J Biochem*, 193 (1990) 409-420.
- [30] E. Goormaghtigh, V. Raussens, J.M. Ruysschaert, Attenuated total reflection infrared spectroscopy of proteins and lipids in biological membranes, *Biochim Biophys Acta*, 1422 (1999) 105-185.
- [31] M.L. Jobin, P. Bonnafeux, H. Temsamani, F. Dole, A. Grelard, E.J. Dufourc, I.D. Alves, The enhanced membrane interaction and perturbation of a cell penetrating peptide in the presence of

- anionic lipids: toward an understanding of its selectivity for cancer cells, *Biochim Biophys Acta*, 1828 (2013) 1457-1470.
- [32] M.N. Melo, M.A. Castanho, Omiganan interaction with bacterial membranes and cell wall models. Assigning a biological role to saturation, *Biochim Biophys Acta*, 1768 (2007) 1277-1290.
- [33] A.S. Ladokhin, Distribution analysis of depth-dependent fluorescence quenching in membranes: a practical guide, *Methods Enzymol*, 278 (1997) 462-473.
- [34] A.S. Ladokhin, P.W. Holloway, E.G. Kostrzhevskaya, Distribution analysis of membrane penetration of proteins by depth-dependent fluorescence quenching, *J Fluoresc*, 3 (1993) 195-197.
- [35] F.S. Abrams, E. London, Calibration of the parallax fluorescence quenching method for determination of membrane penetration depth: refinement and comparison of quenching by spin-labeled and brominated lipids, *Biochemistry*, 31 (1992) 5312-5322.
- [36] F.S. Abrams, E. London, Extension of the parallax analysis of membrane penetration depth to the polar region of model membranes: use of fluorescence quenching by a spin-label attached to the phospholipid polar headgroup, *Biochemistry*, 32 (1993) 10826-10831.
- [37] A. Chattopadhyay, E. London, Parallax method for direct measurement of membrane penetration depth utilizing fluorescence quenching by spin-labeled phospholipids, *Biochemistry*, 26 (1987) 39-45.
- [38] P.E. Thoren, D. Persson, E.K. Esbjorner, M. Goksor, P. Lincoln, B. Norden, Membrane binding and translocation of cell-penetrating peptides, *Biochemistry*, 43 (2004) 3471-3489.
- [39] I.D. Alves, S.M. Cowell, Z. Salamon, S. Devanathan, G. Tollin, V.J. Hruby, Different structural states of the proteolipid membrane are produced by ligand binding to the human delta-opioid receptor as shown by plasmon-waveguide resonance spectroscopy, *Mol Pharmacol*, 65 (2004) 1248-1257.
- [40] Z. Salamon, G. Tollin, Optical anisotropy in lipid bilayer membranes: coupled plasmon-waveguide resonance measurements of molecular orientation, polarizability, and shape, *Biophys J*, 80 (2001) 1557-1567.
- [41] Z. Salamon, G. Tollin, I. Alves, V. Hruby, Chapter 6. Plasmon resonance methods in membrane protein biology applications to GPCR signaling, *Methods Enzymol*, 461 (2009) 123-146.
- [42] G. Drin, S. Cottin, E. Blanc, A.R. Rees, J. Temsamani, Studies on the internalization mechanism of cationic cell-penetrating peptides, *J Biol Chem*, 278 (2003) 31192-31201.

- [43] H.L. Lee, E.A. Dubikovskaya, H. Hwang, A.N. Semyonov, H. Wang, L.R. Jones, R.J. Twieg, W.E. Moerner, P.A. Wender, Single-molecule motions of oligoarginine transporter conjugates on the plasma membrane of Chinese hamster ovary cells, *J Am Chem Soc*, 130 (2008) 9364-9370.
- [44] B. Christiaens, J. Grooten, M. Reusens, A. Joliot, M. Goethals, J. Vandekerckhove, A. Prochiantz, M. Rosseneu, Membrane interaction and cellular internalization of penetratin peptides, *Eur J Biochem*, 271 (2004) 1187-1197.
- [45] S.T. Henriques, M.A. Castanho, Environmental factors that enhance the action of the cell penetrating peptide pep-1 A spectroscopic study using lipidic vesicles, *Biochim Biophys Acta*, 1669 (2005) 75-86.
- [46] N.C. Santos, M. Prieto, M.A. Castanho, Quantifying molecular partition into model systems of biomembranes: an emphasis on optical spectroscopic methods, *Biochim Biophys Acta*, 1612 (2003) 123-135.
- [47] P.M. Matos, H.G. Franquelim, M.A. Castanho, N.C. Santos, Quantitative assessment of peptide-lipid interactions. Ubiquitous fluorescence methodologies, *Biochim Biophys Acta*, 1798 (2010) 1999-2012.
- [48] M. Rodrigues, A. Santos, B.G. de la Torre, G. Radis-Baptista, D. Andreu, N.C. Santos, Molecular characterization of the interaction of crotamine-derived nucleolar targeting peptides with lipid membranes, *Biochim Biophys Acta*, 1818 (2012) 2707-2717.
- [49] A. Walrant, A. Vogel, I. Correia, O. Lequin, B.E. Olausson, B. Desbat, S. Sagan, I.D. Alves, Membrane interactions of two arginine-rich peptides with different cell internalization capacities, *Biochim Biophys Acta*, 1818 (2012) 1755-1763.
- [50] C. Bechara, S. Sagan, Cell-penetrating peptides: 20 years later, where do we stand?, *FEBS Lett*, 587 (2013) 1693-1702.
- [51] M. Nishihara, F. Perret, T. Takeuchi, S. Futaki, A.N. Lazar, A.W. Coleman, N. Sakai, S. Matile, Arginine magic with new counterions up the sleeve, *Org Biomol Chem*, 3 (2005) 1659-1669.
- [52] C. Bechara, M. Pallerla, Y. Zaltsman, F. Burlina, I.D. Alves, O. Lequin, S. Sagan, Tryptophan within basic peptide sequences triggers glycosaminoglycan-dependent endocytosis, *FASEB J*, 27 (2013) 738-749.

- [53] H.A. Rydberg, A. Kunze, N. Carlsson, N. Altgarde, S. Svedhem, B. Norden, Peptide-membrane interactions of arginine-tryptophan peptides probed using quartz crystal microbalance with dissipation monitoring, *Eur Biophys J*, 43 (2014) 12.
- [54] H.A. Rydberg, M. Matson, H.L. Amand, E.K. Esbjorner, B. Norden, Effects of Tryptophan Content and Backbone Spacing on the Uptake Efficiency of Cell-Penetrating Peptides, *Biochemistry*, 51 (2012) 5531-5539.
- [55] S. Deshayes, T. Plenat, G. Aldrian-Herrada, G. Divita, C. Le Grimmellec, F. Heitz, Primary amphipathic cell-penetrating peptides: structural requirements and interactions with model membranes, *Biochemistry*, 43 (2004) 7698-7706.